

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/79

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/47 C07K 14/475

A61K 48/00 A61K 38/17

[21] 申请号 99809287.8

[43]公开日 2001 年 9 月 5 日

[11]公开号 CN 1311822A

[22]申请日 1999.6.2 [21]申请号 99809287.8

[30]优先权

[32]1998.6.2 [33]GB [31]9811836.7

[32]1998.7.11 [33]GB [31]9815035.2

[32]1998.9.12 [33]GB [31]9819846.8

[32]1998.12.23 [33]GB [31]9828578.6

[86]国际申请 PCT/GB99/01722 1999.6.2

[87]国际公布 WO99/62561 英 1999.12.9

[85]进入国家阶段日期 2001.2.2

[71]申请人 葛兰素集团有限公司

地址 英国梅得塞克斯

[72]发明人 M·布拉多克 C·J·坎贝尔

J·L·施瓦赫特根

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 谭明胜

权利要求书 5 页 说明书 50 页 附图页数 30 页

[54]发明名称 基因治疗方法

[57]摘要

本发明涉及一种 Egr-1 转录因子多肽、或它的一段生物活性片段、以及编码这种多肽的核酸分子在生产一种用于治疗哺乳动物(包括人类)伤口的药物中的应用。另外,本发明也涉及一段序列,该序列被认为包括涉及转录因子 Egr-1 在人体内的转录及其调控的重要区域。该序列可以被用于设计可以被用于伤口的治疗以及其它治疗的合适的核酸分子和载体。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一种含有一段编码 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段的序列的核酸分子在生产一种用于治疗哺乳动物，包括人类伤口的药物中的应用。

5 2. 依据权利要求 1 中所述的应用，其中的 Egr-1 是人的 Egr-1。

3. 依据权利要求 1 或权利要求 2 中所述的应用，其中包括上述编码 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段的序列的核酸分子与一段控制表达的核酸序列操作性连接。

4. 依据权利要求 3 中所述的应用，其中控制表达的核酸序列：

10 a) 具有一条含有图 7 中所提供的 GW SEQ 序列的链；或者

b) 具有一条含有相对于 GW SEQ 有一个或多个删除、插入和/或替换的链，但其不含有图 7 中所显示的 ON SEQ 序列以及其也不含有图 9 中所显示的序列。

15 5. 依据以上任何一项权利要求中所述的应用，其中的核酸分子是通过物理方法被施用到哺乳动物中的。

6. 依据权利要求 5 中所述的应用，其中的核酸分子是通过颗粒轰击的方法施用到哺乳动物中的。

7. 依据权利要求 6 中所述的应用，其中的核酸分子是固定在全颗粒上的。

20 8. 依据权利要求 5 中所述的应用，其中的核酸分子是通过微量接种(microseed)进行施用的。

9. 依据以上任何一项权利要求中所述的应用，其中的核酸分子是在一种载体上。

25 10. 依据权利要求 9 中所述的应用，其中的核酸分子是在一种细胞内。

11. 一种包括一段编码一种用于治疗伤口的 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段的序列的核酸分子。

30 12. 一种包括一种含有一段编码 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段的序列的核酸分子以及它的一种或多种治疗上可接受的载体的药剂组合物。

13. 一种治疗哺乳动物包括人类伤口的的方法，该方法包括对该哺乳动物施用一种包括一段编码 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段

的序列的核酸分子。

14. 一种 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段在生产一种用于治疗哺乳动物(包括人类)伤口的药物中的应用。

15. 依据权利要求 14 中所述的应用, 其中的 Egr-1 或其生物活性片段是天然地、合成地或重组产生的。

16. 依据权利要求 14 或 15 中所述的应用, 其中的 Egr-1 是人的 Egr-1。

17. 一种用于治疗伤口的 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段。

18. 一种治疗哺乳动物包括人类伤口的的方法, 该方法包括对该哺乳动物施用治疗上有效剂量的一种 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段的序列的核酸分子。

19. 一种包括 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段以及一种或多种治疗上可接受的载体的药剂组合物。

20. 一种核酸分子, 其:

a) 具有一条含有图 7 中所提供的 GW SEQ 序列的链; 或者

b) 具有一条含有相对于 GW SEQ 有一个或多个删除、插入和/或替换的链, 但其不含有图 7 中作为 ON SEQ 显示的序列以及其也不含有图 9 中所显示的序列; 或者

c) 具有一条与以上 a) 或 b) 中所描述的链杂交的链。

21. 依据权利要求 20 中所述的核酸分子, 其中该分子包括一个或多个血清应答因子(SRE)。

22. 依据权利要求 21 中所述的核酸分子, 包括图 7 的 GW SEQ 中标作 SRE5 的序列或它的一种功能变体。

23. 依据权利要求 22 中所述的核酸分子, 其中上述变体相对于图 7 中所显示的 ON SEQ SRE5, 在 GW SEQ SRE5 中至少有一个核苷酸的区别。

24. 依据以上权利要求 20 到 23 任何一项中所述的核酸分子, 其包括图 7 中作为 SRE3 和 SRE4 显示的血清应答因子或其功能变体。

25. 依据以上权利要求 20 到 24 任何一项中所述的核酸分子, 其包括一个 TATA 盒子。

26. 依据权利要求 25 中所述的核酸分子, 其中的 TATA 盒子包括

序列 AAATA.

27. 依据权利要求 20 到 26 任何一项中所述的核酸分子, 其包括一个 Egr-1 结合位点 (EBS).

28. 依据权利要求 27 中所述的核酸分子, 其中的 Egr-1 结合位点具有图 7 GW SEQ 中标为 EBS 的序列或具有上述序列的一种变体.

29. 依据权利要求 20 到 28 任何一中所述的核酸分子, 其中上述变体相对于图 7 GW SEQ 中标为 EBS 的序列, 对 Egr-1 的亲和力降低.

30. 依据权利要求 29 中所述的核酸分子, 其中上述变体包括图 2 中所显示的 EBS 序列.

31. 依据权利要求 20 到 26 任何一项中所述的核酸分子, 其不具有 Egr-1 结合位点.

32. 依据权利要求 20 到 31 任何一项中所述的核酸分子, 其包括一段可以结合 Sp1 的序列.

33. 依据权利要求 32 中所述的核酸分子, 其包括两段可以结合 Sp1 的序列.

34. 依据权利要求 32 或权利要求 33 中所述的核酸分子, 其包括图 7 中所显示的 GW SEQ 的一个 Sp1 结合位点或两个均包括.

35. 依据权利要求 20 到 34 任何一项中所述的核酸分子, 其包括一个 cAMP 应答因子.

36. 依据权利要求 35 中所述的核酸分子, 其包括至少一个图 7 GW SEQ 中标为 cAMP RE 的 cAMP 应答因子.

37. 依据权利要求 35 或权利要求 36 中所述的核酸分子, 其包括图 7 GW SEQ 中显示的第一个 cAMP RE.

38. 一种包括图 7 中显示的 GW SEQ 的所有盒子序列的核酸分子, 可选择性地除 EBS 序列之外.

39. 一种包括图 7 中所显示 GW SEQ 分子的一种变体的核酸分子, 该变体相对于图 7 中显示的 GW SEQ 分子, 能够使得 Egr-1 的转录水平升高.

40. 一种包括图 7 中所显示 GW SEQ 分子的一种变体的核酸分子, 该变体相对于图 7 中显示的 GW SEQ 分子, 能够使得 Egr-1 的转录水平降低.

41. 依据权利要求 20 到 40 任何一项中所述的核酸分子, 其包括

一段编码 Egr-1 的序列。

42. 一种包括依据权利要求 20 到 41 任何一项中所述的分子的核酸载体。

43. 一种包括依据权利要求 20 到 41 任何一项中所述的核酸分子或依据权利要求 42 中所述的载体的细胞。

44. 一种治疗患者的方法，包括对该患者施用依据权利要求 20 到 41 任何一项中所述的核酸分子、依据权利要求 42 中所述的载体、或依据权利要求 43 中所述的细胞。

45. 一种治疗患者的方法，包括对该患者施用使用依据权利要求 20 到 41 任何一项中所述的核酸分子、使用依据权利要求 42 中所述的载体、或使用依据权利要求 43 中所述的细胞产生的 Egr-1。

46. 依据权利要求 44 或 45 中所述的方法，其中的治疗是对伤口的治疗(包括伤口愈合和相关症状及治疗，其促进、增强或加速组织的愈合，并包括治疗糖尿病和末梢动脉闭塞病中的肢体溃疡、手术后疤痕、烧伤、牛皮癣，加速组织重塑和骨修复，及在经皮腔内冠状动脉成形术之后促进血管生成、上皮再生)。

47. 依据权利要求 44 到 46 任何一项中所述的方法，其中的核酸分子或 Egr-1 被施用到伤口上或伤口附近。

48. 一种诊断的方法，包括使用依据权利要求 20 到 40 任何一条中所述的核酸分子作为探针以确定是否存在遗传缺陷。

49. 一种筛选的方法，包括使用依据权利要求 20 到 40 任何一条中所述的核酸分子，通过结合研究以鉴定潜在的治疗基因。

50. 一种鉴定一种能够上或减量调节 Egr-1 转录的制剂的方法，包括提供一种相对于依据权利要求 20 到 40 任何一项中所述的核酸分子(如相对于一种包括图 7 中所显示的 SW SEQ 分子)具有一个或多个核苷酸变化的核酸分子，并确定上述变化是否会影响 Egr-1 的转录水平。

51. 一种通过依据权利要求 49 或权利要求 50 所述的方法鉴定的制剂。

52. 一种药剂组合物，其包括一种治疗上可接受的载体和依据权利要求 20 到 41 任何一项中所述的核酸分子、依据权利要求 42 中所述的载体、或依据权利要求 43 中所述的细胞。

53. 一种药剂组合物，其包括一种治疗上可接受的载体和使用依据权利要求 20 到 41 任何一项中所述的核酸分子、依据权利要求 42 中所述的载体、或依据权利要求 43 中所述的细胞产生的 Egr-1.

说明书

基因治疗方法

本发明涉及基因治疗技术在伤口愈合和相关症状中的应用。更具体地讲，本发明涉及编码早期生长应答-1 (Egr-1) 转录因子的多聚核苷酸在治疗伤口、伤口愈合和相关症状中的一个新的应用，如用于治疗由局部缺血引起的皮肤溃疡和与糖尿病、外周动脉闭塞病、深静脉血栓症、慢性静脉功能不全和褥疮相关的神经病，与如白内障、皮肤移植、烧伤、鳞癣相关的术后瘢痕，加速组织改型和再生；硬组织修复，如骨骼；软组织修复，如腱、韧带、肌肉，血管生成的加速，穿皮的经腔冠状血管成形术之后的上皮再生，左心室心脏肥大的抑制，血管内壁钙化的调节和神经再生的调节。

进一步的应用可能包括纤维化症状的抑制，如肺部和肝脏纤维化，以及脱发的抑制。

本发明也涉及 Egr-1 的转录及其调节。

皮肤愈合包括广范围的细胞、分子、生理和生化事件。在愈合的过程中，细胞迁移到伤口部位，它们在该处增生并合成细胞外基质成分，以便重新构建十分类似于未受损伤的原始组织的组织。该活性由伤口边缘细胞分泌的介体调节，如血小板衍生生长因子 (PDGF)、表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 (TGF) β 和其它细胞因子。这些介体对于细胞的有利作用已经在体外和体内被证实 (由 Moulin 综述, Eur. J. Cell Biol. 68; 1-7, 1995)，包括对糖尿病大鼠模型施用 PDGF 的益处 (Brown 等, J. Surg. Res. 56; 562-570, 1994)。

在过去的五年里，许多生长因子已经显示出在体外可以加速细胞增殖并在动物模型中可以加速伤口愈合。在伤口修复的领域中，TGF β 已经受到最大重视，因为它能促进细胞增殖、分化和基质产生。在动物模型中，局部或系统地施用 TGF β 加速了皮肤伤口的修复 (Ashcroft 等, 自然医学, 3; 1209-1215, 1997; Sporn 和 Roberts 细胞生物学杂志 119; 1017-1021, 1997; Beck 等 J. Clin. Invest. 92; 2841-2849, 1993)。同样地，PDGF 已经被报道在局部缺血的组织和糖尿病动物内可以增强上皮再生和血管的再形成 (Uhl 等 Langenbecks Archiv fur Chirurgie-Supplement-Kongressband 114;

705-708, 1997 及 Dirks 和 Bloemers 的综述, 分子生物学报道 22; 1-24, 1996)。

转录因子 Egr-1 是超过 30 个基因的的潜在调节子, 并在生长、发育和分化中担任重要角色 (Liu 等的综述 Crit. Rev. Oncogenesis 7; 101-125, 1996; Khachigian 和 Collins Circ. Res. 81; 457-461, 1997)。Egr-1 是由血管内皮的损伤诱导的 (如 Khachigian 等 科学; 271, 1427-1431, 1996), 并且转录活化的目标是多个基因, 包括表皮生长因子 (EGF)、血小板衍生生长因子-A (PDGF-A)、碱性纤维母细胞生长因子 (bFGF)、诱导 PDGF A、PDGF B、TGF β 、bFGF、尿纤维蛋白酶原活化因子 (u-PA)、组织因子和胰岛素样生长因子-2 (IGF-2)。

调节血管内皮生长因子 (VEGF) 诱导的转录复合物是直接依赖于 AP2 而不是 Egr-1 (Gille 等, EMBO J 16; 750-759, 1997)。然而, PDGF B 直接增量调节 VEGF 的表达 (Finkenzeller Oncogene 15; 669-676, 1997)。VEGF mRNA 转录的增强是通过许多因子, 包括 PDGF B、bFGF、角质细胞生长因子 (KGF)、EGF、肿瘤坏死因子 (TNF) α 和 TGF β 1。VEGF 已经可以促进瓣膜损伤的动脉内的上皮再生。在兔子中获得的数据显示出明显的 VEGF 驱动的金属支架钝化抑制了支架内新血管内膜的形成, 血栓阻塞的发生减少, 假肢上皮再生的加速和血管收缩神经活性的提高 (van Belle, E. 等, Biochem. Biophys. Res. Comm., 235; 311-316, 1997; van Belle, E. 等, J. Am. Coll. Cardiol., 29; 1371-1379, 1997; Asahara, T., 等, 循环, 94; 3291-3302, 1997)。在人类中进行 VEGF 促进上皮再生的初步研究的 NIH 批准在 1996 年获得通过。另外, 在颈动脉干道损伤的大鼠模型中, HGF 也已经显示出可以在瓣膜血管形成术之后促进上皮再生 (Nakamura 等, 摘要 1681, 美国心脏相关会议; Dallas, 1998)。在动物模型中, VEGF 驱动的金属支架的钝化已经显示出可以抑制新血管内膜的形成、加速上皮再生和提高血管收缩神经的活性 (Asahara 等, 循环; 94, 3291-3302)。

VEGF 表达已经在愈合伤口和牛皮癣皮肤中被报道, 在两种疾病中 TGF α 及其配体 EGF 受体 (EGFr) 被增量调节。EGF 的表达诱导了 Egr-1 (Iwami 等, Am. J. Physiol. 270; H2100-2107, 1996; Fang 等, Calcified Tissue International 57; 450-455, 1995; J.

Neuroscience Res. 36; 58-65, 1993)。目前有轶事样的证据, 即 Egr-1 可能激活细胞间粘连分子(ICAM-1)在佛波酯激活的 B-淋巴细胞内的表达(Maltzman 等, 分子细胞生物学 16; 2283-2294, 1996), 并且可能由于一个 Egr-1 结合位点在 TNF α 启动子上的存在, 而激活 TNF α 的表达(Kramer 等, Biochim. Biophys. Acta 1219; 413-421, 1994)。最后, Egr-1 剔除小鼠为不育及促黄体生成激素(LH)缺陷型(Lee 等, 科学 273; 1219-1221, 1996), 暗示着 LH 启动子可能也是 Egr-1 活化的一个目标。

骨负重、机械拉伸和类似于造骨细胞的 MC3T3E1 细胞的液体流动诱导了 Egr-1(Dolce 等 Archs. Oral Biol. 41; 1101-1118, 1996; Ogata 细胞生理学杂志 170; 27-34, 1997), 同时伴随着生长因子的活化。Egr-1 的表达在发育小鼠的软骨和骨中占主要地位(McMahon 等, 发育 108; 281-287), 并且已经涉及造骨细胞的生长和分化的调节(Chaudhary 等, 分子细胞生物化学 156; 69-77, 1996)。Egr-1 和与其紧密相关的锌指转录因子 Wilm's 肿瘤 1 (WT1)已经涉及破骨细胞生成(Kukita 等, 内分泌学 138; 4384-4389, 1997), 而且前列腺环素 E2(PGE2)和 EGF 均由 Egr1 诱导(Fang 等 钙化组织国际 57, 450-455, 1995; Fang 等前列腺素、白三烯和必需的脂肪酸 54; 109-114, 1996)。血管钙化是一种类似于骨形成的活化调节的过程, 其包括已知在骨代谢调节中很重要的细胞和因子(Dermer 等综述, Trends Cardiovasc. Med. 4; 45-49, 1994)。造骨细胞生成和/或破骨细胞生成的调节剂可以调节血管壁钙化的程度。

肥大刺激如血动力负荷和血管收缩素 II 可以被用于驱动主要在一中肌细胞特异性启动子的控制之下的显性失活的 Egr-1 的产生, 并且在治疗心力衰竭中具有应用。

Egr-1 是施万细胞表达 p75 神经生长因子(NGF)受体所必需的(Nikam 等 分子细胞神经科学 6; 337-348, 1995)。NGF 诱导 Egr-1 的表达, 同时伴随着生长因子的活化(Kendall 等, 脑研究, 分子脑研究. 25; 73-79, 1994; Kujubu 等, 神经科学研究杂志 36; 58-65, 1993),

目前已经发现在受伤的部位施用一种编码转录因子 Egr-1 的多核苷酸, 并随后表达它, 促进了愈合的加速。

因此,依据本发明的第一个方面,提供了一种包括编码一种 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段的序列的核酸分子在生产一种治疗哺乳动物(包括人类)伤口的药物中的应用。

为了避免任何怀疑,提及一种多聚核苷酸和任何提及一种多聚核
5 酸分子是意义相同的。

依据本发明的第二个方面,提供了一种治疗哺乳动物(包括人类)伤口的方法,该方法包括对该哺乳动物施用一种核酸分子,该分子包括一段编码一种 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段的序列。

依据第三个方面,本发明提供了一种用于治疗伤口的核酸分子,
10 其包括一段编码一种 Egr-1 转录因子多肽或其一段生物活性片段的序列。

在第四个方面,本发明提供了一种药剂组合物,其包括一种含有一段编码 Egr-1 或其一段生物活性片段的序列的核酸分子及其一种或多种在药理学上可接受的载体。

15 本发明因此涉及编码 Egr-1 转录因子的多聚核苷酸在治疗伤口中的治疗用途。本发明也涉及一种 Egr-1 转录因子本身在治疗伤口中的治疗用途,如以下更详细的描述。

本发明涉及来自任何来源或物种的 Egr-1 多肽和编码 Egr-1 的核酸序列的应用。该蛋白序列在物种之间的是高度保守的,例如大鼠和小鼠之间有 98% 同源性。鼠 Egr-1 DNA 序列是已知的(细胞, 53 37-43 (1988))。其推测的氨基酸序列显示出一段长的开放读框,终止密码子(TAA)在 1858 位上。所推测的氨基酸序列预测是具有 533 个氨基酸的多肽,分子量为 56,596。来自其它物种的相应序列可以通过本领域已知的方法获得,如通过使用基于或来源于鼠 Egr-1 序列的低聚核苷酸序列作为探针,筛选基因组或 cDNA 文库。已知人类 Egr-1 位于 5 号染色体上,更准确地是在 5q23-31 (细胞 53, 37-43)。人类 Egr-1 cDNA 的序列如核酸研究 18 第 4283 页,1990 中所描述。小鼠和人类的序列在核酸和蛋白水平上的相似性分别为 87% 和 94%。
20 25

提及下文所描述的 Egr-1 多肽和多聚核苷酸对于任何来源的序列是普遍适用的,包括如细胞, 53 37-43 (1998) 中所发表的鼠 Egr-1 DNA 和相应的氨基酸序列,以及如核酸研究 18 第 4283 页,1990 中所发表的人类序列,以及来自其它物种的序列。如以下将要描述的,术语
30

Egr-1 也包括 Egr-1 的变体、片段和类似物。最优选的，是使用人类的序列。

提供以下的说明性解释以帮助对本说明书中所使用的特定术语的理解。所提供的解释仅是作为一种方便，而不是本发明的限制。

5 “治疗伤口”包括对与创伤、伤口愈合及其相关症状相关的症状的治疗和促进、增强或加速组织愈合的治疗，以及包括治疗在糖尿病和外周动脉阻塞疾病中的肢体溃疡、手术后疤痕、烧伤、牛皮癣，加速组织的重建和骨修复以及促进血管生成、经皮腔内冠状动脉成形术后的上皮再生，抑制左心室心脏肥大，调节血管壁钙化，以及促进
10 神经再生。其进一步包括抑制纤维化的症状，如肺部和肝脏纤维化，以及阻止脱发。

本说明书中所说的 Egr-1 的“生物活性片段”是一段具有 Egr-1 活性的片段，该活性包括本发明的伤口愈合性质。

15 “遗传因子”通常是指一段含有编码一种多肽的区域的多聚核苷酸，或是一段调节复制、转录或翻译或其它对于该多肽在宿主细胞内体外因子表达很重要的过程的多聚核苷酸区域，或是一种包括一段编码一种多肽的区域和一段与其操作性连接以调节表达的区域的多聚核苷酸。遗传因子可以包括在一种作为染色体外因子复制的载体内；也就是，作为一种在物理上独立于宿主细胞基因组的分子。它们可以
20 包括在质粒内。遗传元件也可以包括在一种宿主细胞基因组内；但不是处于它们的天然状态，而是，在如分离、克隆的操作之后以一种纯化的 DNA 的形式转入到宿主细胞内或存在于一种载体上。

“宿主细胞”是一种已经被转化或转染的细胞，或者是可以被一段外源的多聚核苷酸序列转化或转染的细胞。

25 “同一性”，如本领域所公知的，是通过比较序列而确定的，两种或更多种多肽序列之间或者是两种或更多种多聚核苷酸序列之间的关系。在本领域中，同一性也表示多肽或多聚核苷酸序列之间的序列相关性，这种情况可以，通过比较这些序列的信息串进行确定。同一性可以容易地被计算（计算的分子生物学，Lesk, A.M., 编辑，牛津大学出版社，New York, 1988；生物计算：信息学和基因组计划，
30 Smith, D.W., 编辑，学术出版社，New York, 1993；序列数据的计算机分析，第一部分，Griffin, A.M., 和 Griffin, H.G. 编辑.,

Humana Press, New Jersey, 1994; 分子生物学中的序列分析, von Heinje, G., 学术出版社, 1987; 以及序列分析引物, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑, M Stockton Press, New York, 1991). 虽然存在许多用来测定两种多聚核苷酸或两种多肽序列之间的同一性的方法, 但该术语是本领域技术人员熟知的 (分子生物学中的序列分析, von Heinje, G., 学术出版社, 1987; 序列分析引物, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑, M Stockton Press, New York, 1991; 以及 Carillo, H. 和 Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988)). 普遍应用以确定序列之间的同一性的方法包括, 但不局限于 Carillo, H. 和 Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988) 中所公布的方法。设计确定同一性的优选方法来给出所检测序列之间的最大比较。确定同一性的方法在计算机程序中被编成法典。确定两种序列之间同一性的优选计算机程序方法包括, 但不局限于, GCG 程序包 (Devereux, J., 等, *核酸研究* 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、和 FASTA (Atschul, S.F. 等, *分子生物学杂志* 215: 403 (1990))。

“分离的”表示从其天然状态“通过人手工”改变; 即, 如果其是以天然状态发生时, 其已经被改变或从其原始环境被除去, 或二者都有。例如, 一种天然存在的多聚核苷酸或一种以其天然状态天然存在于一种生物有机体内的多肽不是“分离的”, 但是从其天然状态的共生物质中被分离出来的同样的多聚核苷酸或多肽是“分离的”, 如该术语在本说明书中被应用。作为分离的一部分或分离之后, 这种多聚核苷酸可以与其它多聚核苷酸连接, 如 DNA, 以进行突变, 以形成融合蛋白, 以及在某一宿主内进行扩增或表达。分离的多聚核苷酸, 单独的或与其它多聚核苷酸序列连接 (如以载体的形式), 可以在培养物中或在整个有机体内被引入到宿主细胞内。在培养物或在整个有机体内被引入到宿主细胞内之后, 这种 DNA 仍然是被分离的, 如本说明书中所应用的术语, 因为它们将不是其天然存在的形式或其环境不是天然存在的组合物, 并且, 在其中仍然是在本说明书中所用到的术语的含义范围内的分离的多聚核苷酸或多肽。

“多聚核苷酸”一般是指任何多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸, 其可以是未修饰的 RNA 或 DNA 或修饰过的 RNA 或 DNA 或 cDNA。

因此，例如，本说明书中所用到的多聚核苷酸尤其是指，单或双链 DNA、单或双链区域或单、双和三链区域混合物的 DNA、单和双链 RNA、以及单和双链区域的混合物的 RNA、含有 DNA 和 RNA 的杂交分子(其可以是单链，或更典型地，双链、或三链、或单和双链区域的混合物)。

5 另外，本说明书中所用到的多聚核苷酸指包括 RNA 或 DNA 或 RNA 及 DNA 的三链区域。在这些区域中的链可以来自相同的分子或不同的分子。这些区域可以包括一种或更多分子的全部，但更典型地是仅包括部分这些分子中的某一个区域。三链区域中的一个分子常常是低聚核苷酸。如本说明书中所用到的，术语多聚核苷酸包括如以上所描述的含有一个或多个修饰过的碱基的 DNA 或 RNA。因此，为了稳定或其它原因，其主链被修饰的 DNA 或 RNA 是“多聚核苷酸”，该术语特意应用在本说明书中。而且，包括以不普遍的碱基(如次黄苷)、或修饰过的碱基(如三苯甲基化的(tritylated)碱基)为两个实例的 DNA 或 RNA 亦属于本发明的术语多聚核苷酸。应该理解的是已经在 DNA 和 RNA 上进行了许多不同的修饰，以实现许多本领域人员所了解的有用的目的。本说明书中所用到的术语多聚核苷酸包括多聚核苷酸的化学、酶促或代谢修饰形式，以及病毒和细胞的 DNA 和 RNA 特性的化学形式，尤其包括简单和复杂的细胞。多聚核苷酸包括短的多聚核苷酸，常常被称作低聚核苷酸。

20 “多肽”，如本说明书中所提到的，包括如以下所描述的所有多肽。多肽的基本结构是熟知的，并且已经在无数教科书和其它本领域的出版物中被描述。在本文中，该术语在此处是指包括两个或更多通过肽键以线性链状相互连接的氨基酸的肽或蛋白。如此处所用到的，该术语指短链(其在本领域中也常常作例如肽、低聚肽段和低聚体)及较长的链(其在本领域通常被称作蛋白质，其有多种类型)。应该理解的是多肽常常包括除了通常作为 20 种天然存在的氨基酸提及的 20 种氨基酸之外的氨基酸，这许多的氨基酸，包括末端氨基酸，可以在特定的多肽内被修饰，或者通过天然的过程，如加工和其它翻译后的修饰，但也可以通过本领域熟知的化学修饰技术。即使是在多肽内天然发生的常见修饰也是太多，以至无法在本文中列尽，但是它们在基础课本已被详细描述并在专题论文中的描述更详细，以及在大量的研究文献中被描述，它们对于本领域熟练的人员是熟知的。

在可以存在于用于本发明的多肽内已知的修饰中有，列出少量说明性的，乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价结合、血红蛋白部分的共价结合、核苷酸或核苷酸衍生物的共价结合、脂质或脂质衍生物的共价结合、phosphatidylinositol*的共价结合、交联，
 5 环化、二硫键形成、去甲基作用、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧化作用、糖基化作用、GPI 锚定的形成、羟基化、碘化作用、甲基化作用、豆蔻酰化、氧化、蛋白分解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋作用、硒化作用、硫酸化、转移 RNA 介导的氨基酸加入到蛋白中，如精氨酸化，和遍在蛋白化。这些修饰
 10 对于熟练人员是熟知的，并且已经在科学文献中被详细描述。几种尤其普遍的修饰，例如糖基化、脂质附着、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、羟基化和 ADP-核糖基化，在大多数基础课本中被描述，例如，如蛋白-结构和分子特性，第二版，T. E. Creighton, W. H. Freeman 和 Company, New York (1993)。有许多有关该主题的详细的综述，
 15 例如，举例来说，由 Wold, F. 提供，翻译后的蛋白修饰：观点和展望，第 1-12 页，在蛋白翻译后的共价修饰中，B. C. Johnson 编辑，学术出版社，New York (1983)；Seifter 等，酶学方法 182:626-646 (1990) 和 Rattan 等，蛋白合成：翻译后修饰和成熟，Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)。应该理解的是，如所熟知的和以上所指出的，
 20 这些多肽并不总是完全线性化的。例如，多肽通常可以是由于翻译后的事件，包括自然加工事件和由人操作带来的不是自然发生的事件的结果。环状的、分支的和分支环状的多肽可以通过非翻译自然过程合成，并通过完全合成的方法进行合成。修饰可以发生在多肽的任何位置，包括主肽链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。事实上，通过
 25 共价修饰对多肽内氨基或羧基基团的封阻，或二者均被封阻，在天然存在和合成的多肽内是普遍的，并且同样地，这些修饰可以存在于本发明的多肽内。例如，在大肠杆菌或其它细胞内产生的氨基末端残基，在蛋白水解加工之前，几乎常常将是 N-甲酰甲硫氨酸。在该肽的翻译后修饰的过程中，在 NH_2 -末端的一个甲硫氨酸残基可能被删除。
 30 因此，本发明涉及本发明中的蛋白的含有甲硫氨酸及不含甲硫氨酸氨基末端变体的使用。发生在一段多肽内的修饰受其制备方法的影响。例如，对于通过在一个宿主内表达一个克隆基因制备的多肽，修饰的

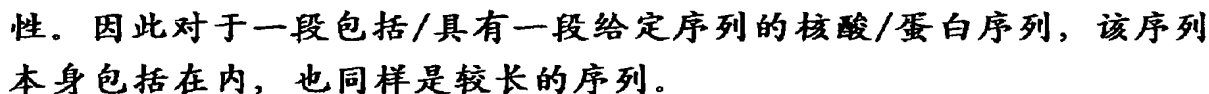
本性和程度，在很大程度上由宿主细胞的翻译后修饰能力和存在于多肽氨基酸序列内的修饰信号来确定。例如，如众所周知的，糖基化常常不在细菌宿主内发生，如，大肠杆菌。因此，当需要糖基化时，一段多肽需要在糖基化宿主内表达，通常是真核细胞。昆虫细胞常常进行与哺乳动物细胞相同的翻译后糖基化作用以及，由于这一原因，特别是昆虫细胞表达体系已经被开发成有效地表达具有糖基化天然模式的哺乳动物蛋白。类似的考虑应用于其它修饰中，应该理解的是相同类型的修饰可以以相同或不同程度存在于一段给定的多肽内的几个位点上。同样，一段给定的多肽可以包括多种类型的修饰。通常，如本文中所用到的，术语多肽包含所有这些修饰，尤其是存在于通过

在一种宿主细胞内表达一段多聚核苷酸来重组性合成的多肽内的修饰。

术语多聚核苷酸或多肽的“变体”，如本文中所用到的，是分别与一段参考多聚核苷酸或多肽不同的多聚核苷酸或多肽。在这一意义上的变体在本说明书中在下文和别处被更详细地描述。(1)在核苷酸序列上与另一段参考多聚核苷酸不同的多聚核苷酸。通常，区别是局限性的，以便参考的核苷酸序列和变体在整体上是十分类似的，并且在许多区域上是相同的。如以下所提到的，在变体的核苷酸序列上的改变可以是沉默的。即是，它们可能不改变由多聚核苷酸编码的氨基酸。当改变是局限于这种类型的沉默改变时，一种变体多聚核苷酸将编码具有与参考相同氨基酸序列的多肽。同样如以下所提到的，在变体多聚核苷酸的核苷酸序列上的变化可能改变由参考多聚核苷酸编码的多肽的氨基酸序列。这种核苷酸的改变可能导致由参考序列编码的多肽内的氨基酸的替代、添加、删除、融合和截短，如以下所讨论的。(2)一段在氨基酸序列上不同于另一段参考序列的多肽。通常，区别是局限性的，以至参考和变体的序列在整体上是十分类似的，并在许多区域相同。一种变体和参考多肽可能通过一个或多个替代、添加、删除、融合和截短而在氨基酸序列上不同，其能以任何组合存在。

“治疗/疗法”包括任何能够有利于人类或非人类的动物的方法。治疗可能是针对一种存在的症状或可能是预防性的(预防性治疗)。

“包括/具有”包含任何包括一种特定的特征/特性的事物，以及任何具有该特征/特性的事物，但其也具有一个或多个附加的特征/特



“同系物”被用来包括一种特定的生物活性分子的任何变体，其具有该分子的一种或多种生物活性。

5 本发明涉及核酸分子的治疗作用，该分子包括一段编码一种 Egr-1 多肽的序列。本发明也涉及上述多聚核苷酸序列的编码某一 Egr-1 生物活性片段的片段，或该多聚核苷酸序列的变体，其由于遗传密码的简并性，编码 Egr-1 的功能(也就是生物活性)片段的治疗作用，也涉及由单个或多个碱基替代、添加和/或删除修饰的、功能等
10 同的等位基因变体和相关序列，其编码具有 Egr-1 活性的多肽。

这些可以通过本领域技术人员已知的常规克隆操作获得。

编码 Egr-1 转录因子的多聚核苷酸能够以 DNA、cDNA 或 RNA 的形式存在，如通过克隆获得或通过化学合成技术产生的 mRNA。该 DNA 可以是单或双链。单链 DNA 可以是编码或有义链，或者其可以是非编码或反义链。为了治疗的作用，该多聚核苷酸是以可以在被治疗的患者的创伤部位表达的功能性 Egr-1 转录因子的形式存在。该多聚核苷酸也可以被用于体外生产 Egr-1 多肽以在本发明的进一步治疗方面进行施用，如以下详细描述。

本发明的编码 Egr-1 转录因子多肽的多聚核苷酸可以包括，但不局限于，Egr-1 多肽或其生物活性片段的编码序列。因此，该多聚核苷酸可以同附加的、非编码序列一起提供，该序列包括，例如但不局限于，非编码的 5' 和 3' 序列，如转录、非翻译的序列，其在转录(例如，包括终止信号)、核糖体结合、mRNA 稳定因子中起作用，以及编码附加的氨基酸的附加编码序列，如提供附加功能的序列。本发明的多聚核苷酸也包括，但不局限于，包括 Egr-1 的一种结构基因和其天然相关的遗传因子的多聚核苷酸。

与前述的一致，本说明书中所用到的术语“编码一种多肽的多聚核苷酸”包括含有一段编码 Egr-1 转录因子多肽的序列的多聚核苷酸。该术语包括含有一个单独的编码该多肽的连续区域或不连续区域 (如，被整合的噬菌体或插入序列或编辑打断) 以及附加区域的多聚核苷酸，其也可能含有编码和/或非编码序列。

本发明进一步涉及本说明书中以上所描述的多聚核苷酸的变体,

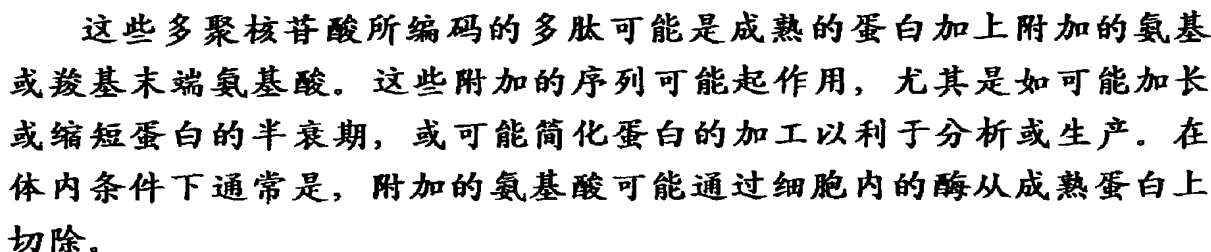
其编码该多肽的片段、类似物和衍生物。该多聚核苷酸的变体可以是一种天然存在的变体，如天然存在的等位基因变体，或其可能是一种未知是天然存在的变体。该多聚核苷酸的这些非天然存在的变体可以通过突变技术构建，包括应用于多聚核苷酸、细胞或有机体中的技术。

在这一方面的变体中，是不同于上述的通过核苷酸替代、删除或添加得到的多聚核苷酸的变体。这些替代、删除或添加可以涉及一个或多个核苷酸。这些变体可能在编码或非编码区域或同时在这两个区域改变。在编码区域的改变可能产生保守或非保守的氨基酸替代、删除或添加。

本发明中进一步优选的实施例是其全长与编码一种具有 *Cell* 53 37-43 (1988) 中列出的氨基酸序列(小鼠序列)的多聚核苷酸具有至少 70% 同一性的多聚核苷酸，更优选的是其全长与 *核酸研究* 18 4283, 1990 中的编码人 cDNA 序列和与其(人序列)互补的多聚核苷酸具有至少 70% 同一性的多聚核苷酸，以及与这些多聚核苷酸互补的多聚核苷酸。可选地，最优选的是其所含有的一段区域的全长与一种编码本发明中的多肽的多聚核苷酸具有至少 80% 同一性的多聚核苷酸。在这一点上，其全长与相同的多聚核苷酸具有至少 90% 同一性的多聚核苷酸是尤其优选的，在这些尤其优选的多聚核苷酸中，至少具有 95% 同一性的是特别优选的。此外，在具有至少 95% 的多聚核苷酸中至少具有 97% 的是高度优选的，在这些中间至少具有 98% 和至少具有 99% 是尤其高度优选的，至少具有 99% 的是更优选的。

此外，在这一点上优选的实施例是，其编码的多肽在本质上保留与 *Cell* 63 37-43 (1988) 中列出的鼠 DNA 序列所编码的鼠 Egr-1 多肽(更优选的是由 *核酸研究* 18 4283, 1990 中列出的人序列所编码的多肽)具有相同的生物功能或活性的多聚核苷酸。

本发明进一步涉及与本说明书中以上所描述的序列杂交的多聚核苷酸。在这一点上，本发明尤其涉及在严格条件下与本说明书中以上所描述的多聚核苷酸杂交的多聚核苷酸。如本说明书中所用到的，术语“严格条件”是指如果在两段序列在之间存在至少 95% 及优选的是至少 97% 的同一性，则将发生杂交。优选的，以这种方式与本发明中的序列杂交的序列所编码的多肽具有 Egr-1 的生物活性。



一种编码 Egr-1 的多聚核苷酸可以用本发明中的方法通过基因治疗发挥治疗作用,其中该多聚核苷酸以其可以在原位指导 Egr-1(或其一段生物活性片段)产生的形式被施用到创伤位置或其它需要愈合的组织。据信, Egr-1 通过活化涉及伤口愈合的基因来促进伤口愈合,如 VEGF、PDGF、EGF、TGF β 、碱性成纤维细胞生长因子、UPA 和组织因子的基因。

如以下更详细的讨论，可以使用天然 Egr-1 启动子。本发明人已经发现已发表的人类 Egr-1 启动子的序列是不正确的，并且已经提供了一个新的序列，其与上述已发表的序列存在多处不同。

12

以通过熟知的、已发表的方法的常规应用从现有载体中构建。

该载体也可以包括转录控制信号，位于 Egr-1 编码序列的 3' 端，也包括多腺苷酸化信号，在被治疗的患者体内是可识别的，例如，举例来说，来自病毒的相应序列如，用于人类治疗的 SV40 病毒。其它
5 转录操纵序列在本领域中是熟知的并可以被使用。

表达载体也可以包括选择性标记，如抗生素抗性，其使载体可以繁殖。

能够在原位合成 Egr-1 的表达载体可以通过物理方法直接引入到创伤位置。这些例子包括局部施用在合适的媒介物内“裸露的”核酸
10 载体，如溶解在治疗上可接受的赋形剂(如磷酸缓冲盐(PBS))内，或通过物理的方法施用载体，如颗粒轰击，也就是所知的“基因枪”技术，依照本领域已知的方法，如在 US-5371015 中所描述的，其中的惰性颗粒，如用载体包裹的金颗粒凭借在高压下从一个发射装置中发射，以足够的速度被加速，使得它们可以在受伤位置(如皮肤细胞)穿
15 透表面。(用本发明中的核酸分子包裹的颗粒在本发明的范围内，同样地，含有这些颗粒的设备也包括在本发明的范围内。)

其它直接将 DNA 施用到接受者体内的物理方法包括超声、电刺激、电穿孔和微量接种。

尤其优选的是微量接种的传递模式，其是在原位将遗传物质传递
20 到患者体内的一种系统。该方法在美国专利编号 5,697,901 中描述。

用于本发明治疗的编码 Egr-1 的核酸序列也可以通过传递载体的方法施用。它们包括病毒传递载体，如本领域已知的腺病毒或逆转录酶病毒传递载体。

其它非病毒传递载体包括脂质传递载体，包括本领域已知的脂质
25 体传递运载体。

一种编码 Egr-1 的核酸序列也可以通过转化宿主细胞的方式施用到受伤位置。这些细胞包括从患者体内收集到的细胞，该核酸序列被引入到其中是通过本领域已知的基因运载的方法，接着通过在培养基中生长该细胞并移植到该患者体内。

30 如以上所描述的表达构建物可以通过多种途径应用于本发明中的治疗上。因此，它们可以直接施用到患者的受伤部位，或者它们可以被用于制备重组的 Egr-1 转录因子，然后其本身可以如以下所更详细

讨论地施用到受伤部位。本发明也涉及宿主细胞，用含有 Egr-1 多聚核苷酸或本发明中的多聚核苷酸或上文中所定义的遗传因子的构建物对所述细胞进行遗传工程改造，本发明也涉及这些载体和细胞在本发明的治疗方法上的应用。这些构建物本身可以被用于本发明的治疗方法中，或者它们可以被用于构建一种在本发明的治疗方法上使用的 Egr-1 多肽，如以下更详细的描述。

该载体可以是，如，一种质粒载体，一种单链或双链噬菌体载体、一种单链或双链 RNA 或 DNA 病毒载体，依赖于该载体是否直接使用到受伤部位(也就是，用于在原位合成 Egr-1)，或者可以被用于合成重组的 Egr-1。本说明书中所公布的起始质粒是商业上提供的、公开提供的、或者可以通过熟知的、已公开的方法操作从现有的质粒构建。可用于本发明的许多质粒和其它克隆和表达载体是熟知的，并且对于本领域熟练的人员是很容易得到的。

通常，用于表达一种在本发明中使用的 Egr-1 多肽的载体包括顺式操作调控区域，它与待表达的多聚核苷酸操作性连接，对在宿主内的表达有利。合适的反式作用因子由宿主提供、由一种互补的载体提供或者由将其引入到宿主内的载体本身提供。

在这一点上的特定实施例中，这些载体提供了特定的表达。为了产生重组的 Egr-1，这种特定的表达可以是可诱导的表达、或者是仅在特定类型的细胞内表达、或者既可诱导又具细胞特异性。在可诱导的载体中尤其优选的是易于操纵的环境因子(如温度或营养添加剂)诱导表达的载体。适用于本发明的这一方面的多种载体，包括用于原核和真核宿主的组成型和可诱导的表达载体，它们是熟知的并且是本领域的熟练人员常规使用的。

很多种表达载体可以被用于表达在本发明中使用的 Egr-1。这些载体包括，尤其是，染色体、游离体和病毒衍生的载体，如来自细菌质粒、来自噬菌体、来自转座子、来自酵母游离体、来自插入因子、来自酵母染色体因子、来自病毒(如杆状病毒、乳头多瘤空泡病毒如 SV40、痘苗病毒、腺病毒、家禽痘病毒、假狂犬病病毒和逆转录病毒)的载体，以及来自组合的载体，如来自质粒和噬菌体作遗传因子的载体，如粘粒和噬菌粒，所有这些载体可以依据本发明的该方面用于表达。通常，任何适于在一种宿主内维持、繁殖或表达多聚核苷酸以便

在宿主中表达一种多肽的载体在这一点上均可以被用于表达。

适当的 DNA 序列可以通过多种熟知和常规技术中的任何一种插入到载体内，如，例如，在 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，第二版； Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) 中所列出的技术。

表达载体内的核酸序列与合适的表达操纵序列(包括，例如，指导 mRNA 转录的启动子)操作性连接。这些启动子的代表包括，但不局限于，噬菌体 λ PL 启动子、大肠杆菌 lac、trp 和 tac 启动子，用于重组表达，及 SV40 早期和晚期启动子以及逆转录病毒 LTRs 启动子用于原位表达。

通常，表达构建物将包含转录起始和终止的位点，以及，在转录区域，将包含用于翻译的核糖体结合位点。由构建物表达的成熟转录产物的编码部分将在开始包括翻译起始 AUG，并在被翻译的多肽末端包括一个在合适位点的终止密码子。

另外，该构建物可能包括调控及诱发表达的操纵区域。通常，依据许多常用的操作，这些区域将通过控制转录进行操作，尤其如转录因子，抑制结合位点和终止。

用于繁殖和表达的载体通常将包括选择性标记和扩增区域，如，例如，在 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，第二版； Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) 中所列出的。

用于重组表达 Egr-1 的合适宿主的代表性的例子包括细菌细胞，如链球菌属、葡萄球菌属、大肠杆菌、链霉菌属和枯草芽孢杆菌细胞；真菌细胞，如酵母细胞和曲霉菌细胞；昆虫细胞如果蝇属 S2 和 *Spodoptera* Sf9 细胞；动物细胞如 CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293 和 Bowes 黑素瘤细胞；以及植物细胞。

以下载体，其为商业上可供的，通过举例的方式提供。在载体中，用于细菌中优选的是 pQE70、pQE60 和 pQE-9，Qiagen 有售；pBS 载体、Phagescript 载体、Bluescript 载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A，Stratagene 有售；以及 ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5，Pharmacia 有售，以及 pBR322 (ATCC 37017)。优选的真核载体中有 pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1 以及 pSG，

Stratagene 有售；以及 pSVK3、pBPV、pMSG 和 pSVL, Pharmacia 有售。列举这些可以被用于重组表达及用于原位表达载体，只是作为在多种商业上提供的载体的说明的，并且是本领域熟练的人员可以利用以依据本发明的该方面进行应用的熟知载体。应该了解的是其它适于，如，在某一宿主内引入、维持、繁殖或表达多聚核苷酸或多肽以用于本发明中的治疗的质粒或载体可以在本发明的这一方面被利用。

用于本发明中这一方面的载体的例子包括表达载体，其中的 Egr-1cDNA 序列被插入到某一质粒内，藉此基因表达由人立即早期巨细胞病毒增强子-启动子驱动 (Foecking 和 Hofstefer, 细胞, 45, 101-105, 1986)。这些表达质粒可以包括 SV40 RNA 加工信号，如多聚腺苷酸化和终止信号。商业上提供的使用 CMV 启动子的表达构建物有 pCDM8、pcDNA1 及其衍生物、pcDNA3 及其衍生物 (Invitrogen)。其它可供的且可以使用的表达载体有 pSVK3 和 pSVL，其含有来自 SV40 (pSVK3) 的 SV40 启动子和 mRNA 剪接位点以及多聚腺苷酸化信号，以及 SV40 VP1 加工信号 (PSVL；来自 Pharmacia 的载体)。

启动子区域可以从任何理想的基因中选取，使用的载体含有一个缺乏启动子区域的报告转录单元，如氯霉素乙酰基转移酶 (“CAT”) 转录单元、限制性酶切位点的下游或用于引入一个候选的启动子片段的位点；即，一段可以含有一个启动子的片段。众所周知，在 cat 基因上游的限制性酶切位点处将一段含有启动子的片段引入载体会引起 CAT 活性的产生，其可以通过标准的 CAT 分析检测。适于此目的的载体是熟知及容易得到的，如 pKK232-8 和 pCM7。用于表达在本发明的治疗中使用多聚核苷酸的启动子不仅包括熟知和容易获得的启动子，而且包括容易通过前述的技术 (使用一种报告基因，用于原位表达) 获得的启动子，这种启动子在被治疗的患者体内将如所希望地被识别。

在已知的原核启动子中，适合表达本发明治疗方法中的多聚核苷酸和多肽的启动子有大肠杆菌 lacI 和 lacZ 启动子、T3 和 T7 启动子、gpt 启动子、λ PR 启动子、PL 启动子和 trp 启动子。

重组的表达载体将包括，例如，复制的起点、一个启动子 (优选的是来自高度表达的基因，以指导下游结构序列的转录)、和一个选择

性标记以使得在载体进入之后可以分离含有载体的细胞。

用于本发明的治疗中的多聚核苷酸，编码本发明中的多肽的异源结构序列，通常可以采用常规的技术被插入到载体内，以与启动子操作性连接来用于表达。该多聚核苷酸将被定位使得转录起始位点大约位于核糖体结合位点的 5' 端。该核糖体结合位点将位于起始将被表达的多肽翻译的 AUG 的 5' 端。

通常，没有其它的开放读框是从起始密码子(常常是 AUG)开始的，它位于核糖体结合位点和起始密码子的中间。而且，通常，在多肽的末尾将有一个翻译终止密码子，并且在构建物中将有一个多聚腺苷酸信号以用于真核宿主。适当地位于转录区域的 3' 末端的转录终止信号也可以包括在多聚核苷酸构建物内。

为了将所翻译的蛋白分泌到内质网的内腔、壁膜间隙或到细胞外的环境中，可以在重组性合成时将适当的分泌信号结合到所表达的多肽内。这些信号可以是该多肽的内源，信号，或者它们可以是异源信号。

该多肽可以以修饰的方式表达，如融合蛋白，也可以不仅包括分泌信号还包括附加的异源功能区域。因此，例如，一段附加氨基酸的区域，尤其是带电荷的氨基酸，可以被加到该多肽的 N-或 C-末端，以在纯化或在后来的操作和贮存中提高在宿主细胞内的稳定性和持久性。而且，也可以在多肽中加上一段区域以利于纯化。这些区域可以在多肽的最后制备之前被除去。尤其是在多肽中加入肽部分引起分泌和排除，以提高稳定性或便于纯化，是本领域熟悉的常规技术。一种优选的融合蛋白包括一段来自免疫球蛋白的异源区域，其对于溶解和纯化多肽是有利的。然后典型地是通过离心收集细胞，通过物理或化学的方法破碎，保留所得到的粗提物以进行进一步的纯化。

用于蛋白表达的微生物细胞可以通过任何简便的方法破碎，包括冻融循环、超声、机械破碎、或使用细胞溶解剂，这些方法是本领域的熟练人员所熟知的。

哺乳动物表达载体可以包括一个复制起点、一个合适的启动子和增强子、也包括任何必要的核糖体结合位点、多聚腺苷酸区域、剪接供体和受体位点、转录终止序列、以及表达所必需的 5' 端侧翼非转录序列。

为了制备用于本发明的 Egr-1 多肽, 可以使用遗传工程构建的宿主细胞。将一段多聚核苷酸引入到宿主细胞可以通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖调节的转染、转位、微量注射、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、刮削负荷(scrape loading)、轰击引入、感染或其它方法。这些方法在许多标准的实验室手册中有描述, 如 Davis 等, 分子生物学基本方法, (1986)和 Sambrook 等, 分子克隆: 实验室手册, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)。

成熟的蛋白可以在适当的启动子的操纵下, 在宿主细胞内表达, 宿主细胞包括哺乳动物细胞(如 CHO 细胞)、酵母、细菌、或其它细胞。也可以采用无细胞翻译系统来生产这些蛋白, 使用来自本发明的 DNA 构建物的 RNA。与原核和真核宿主一起使用的适当的克隆和表达载体披露于 Sambrook 等, 分子克隆: 实验室手册, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)。

该多肽可以通过熟知的方法从重组的细胞培养物中回收和纯化, 这些方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。最优选的, 采用高效液相层析进行纯化。当多肽在分离和纯化过程中被变性时, 可以采用熟知的重折叠蛋白的技术以再生活性构象。

为了治疗, 编码 Egr-1 的多聚核苷酸, 如以重组载体的形式, 可以通过本领域已知的技术纯化, 如通过 Sambrook 等, 分子克隆: 实验室手册, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)中所描述的柱层析的方法。

如以上所显示的, Egr-1 可以在受伤位点作为 Egr-1 编码核酸进行施用, 该核酸本身在受伤位点以基因治疗的形式被转录并翻译成 Egr-1, 或者该转录因子本身可以直接被施用。

因此, 依据本发明的第五个方面, 提供了 Egr-1 转录因子多肽或其生物活性片段在生产一种用于治疗哺乳动物(包括人类)伤口的药物上的应用。

依据本发明的第六个方面, 提供了一种治疗哺乳动物(包括人类)伤口的的方法, 该方法包括对该哺乳动物施用治疗上有效剂量的 Egr-1

转录因子多肽或其生物活性片段。

在第七个方面，本发明提供了一种 Egr-1 转录因子或其生物活性片段的施用，将其应用于治疗伤口及伤口愈合。

5 在第八个方面，本发明提供了一种药物组合物，其包括 Egr-1 转录因子或其生物活性片段，及其一种或多种药用载体。

如本说明书中所用到的，术语“Egr-1 转录因子多肽”包括天然或重组产生的 Egr-1 转录因子，其天然的、合成的和生物活性多肽类似物或变体或衍生物，或其生物活性片段，以及上述片段的变体、衍生物和类似物。

10 包括 Egr-1 转录因子的生物活性片段的 Egr-1 转录因子蛋白产物可以通过本领域已知的常规技术产生和/或分离。

用于本发明中的治疗的 Egr-1 及其上述的片段和衍生物可以通过工艺上已知的方法从天然来源中抽提。这些方法包括通过序列特异性的 DNA 亲和层析进行纯化，采用 Briggs 等，科学 234, 47-52, 1986
15 中所描述的方法，使用一种识别 Egr-1 的 DNA 结合低聚核苷酸。该多肽的制备也可以通过如以上所描述的本领域已知的重组 DNA 技术的方法，即，通过在宿主细胞内表达所描述的构建物。可选地，本发明中的多肽可以通过常规的肽合成仪合成产生。

20 本发明也涉及 Egr-1 的片段、类似物和衍生物的使用。术语“片段”、“衍生物”和“类似物”表示一种基本上保留与这种多肽一样的生物功能或活性的多肽。因此，一种类似物包括一种前蛋白，其可以通过切除前蛋白部分被激活以形成活化的成熟多肽。

该多肽的片段、衍生物或类似物可以为 (i) 其中的一个或多个氨基酸残基被一个保守的或非保守的氨基酸残基(优选的是一个保守的氨基酸残基)替代、并且这些替代的氨基酸残基可能是或可能不是被遗传密码编码的残基的多肽，或者 (ii) 其中的一个或多个氨基酸残基含有一个取代基的多肽，或者 (iii) 其中的成熟多肽与另一种化合物融合、如一种提高该多肽的半衰期的化合物(如聚乙二醇)的多肽，或者 (iv) 其中附加的氨基酸被融合到成熟的多肽内、如一段前导或分泌序列或一段用于成熟多肽的纯化的序列或一段前蛋白序列的多肽。从本说明书中的指导来看，这些片段、衍生物和类似物被认为是在本领域
30 熟练的人员的知识范围之内。

优选的变体是通过保守氨基酸的替代而与天然发生的 Egr-1 不同的变体。这些替代是在一段多肽序列内用具有类似性质的另一种氨基酸替代一种给定的氨基酸。典型地作为保守替代的是替代，在脂肪族氨基酸 Ala、Val、Leu 和 Ile 中，一种换成另一种；羟基残基 Ser 和 Thr 的互换，酸性残基 Asp 和 Glu 的互换，酰胺残基 Asn 和 Gln 之间的替换，碱性残基 Lys 和 Arg 之间的互换，以及芳香残基 Phe、Tyr 之间的替代。

在这一点上进一步尤其优选的是变体、类似物、衍生物和片段，以及该片段的变体、类似物和衍生物，具有该多肽的氨基酸序列，其中几个，一些，5 到 10 个，1 到 5 个，1 到 3 个，2 个，1 个或没有氨基酸残基被替代、删除或添加，以任何方式组合。这其中尤其优选的是沉默替代、添加和删除，其不改变本发明中的多肽的性质和活性。在这一点上也尤其优选的是保守的替换。

尤其优选的片段是生物活性片段，即保留亲本多肽的伤口愈合特性的片段。

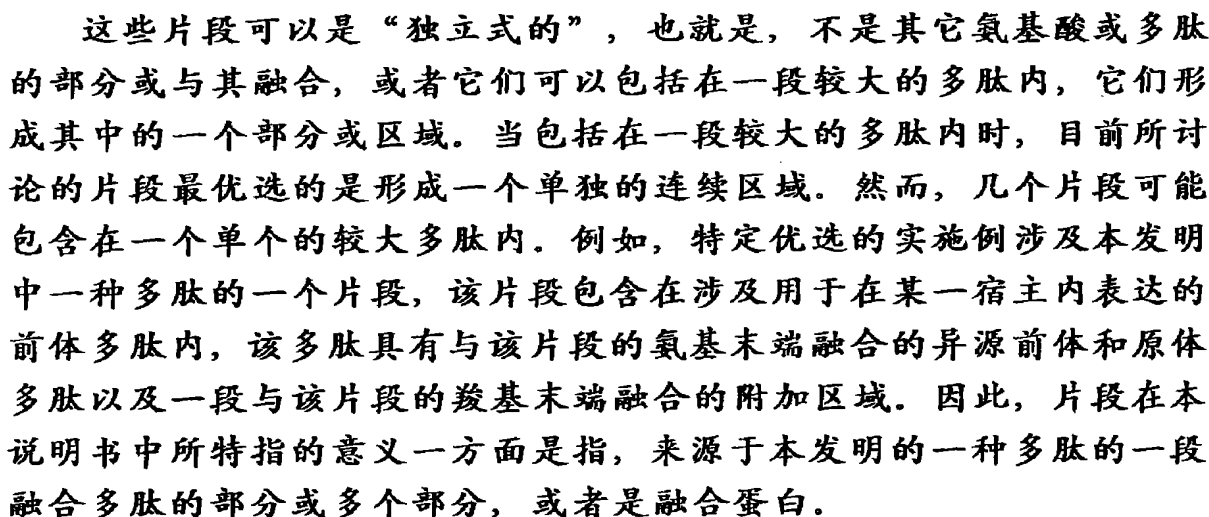
在本发明中有用的多肽和多聚核苷酸优选的是以分离的形式提供，并且优选的是被纯化以具同质性。

用于本发明的 Egr-1 多肽包括 Egr-1 多肽以及与如细胞 53 37-43 (1988) 中所列出的鼠多肽序列和与由人序列编码的多肽具有至少 70% 同一性，优选的至少 80% 同一性以及更优选的至少 90% 以上的同一性，以及更加优选的是至少 95% 相似性 (更优选的是至少 99% 同一性) 的多肽，并且也包括这些多肽的部分，多肽的这些部分通常含有至少 30 个氨基酸，更优选的是至少 50 个氨基酸。

在本发明的治疗中有用的多肽的片段或部分可以被用于通过肽合成构建相应的全长多肽；因此，这些片段可以作为中间物采用以构建全长的多肽。在本发明中有用的多聚核苷酸的片段或部分可以被用于合成在本发明中有用的全长多聚核苷酸。

本发明也涉及本说明书中以上所定义的 Egr-1 多肽的片段和变体的片段及其衍生物的应用。

在这一点上，一段片段是一段所具有的氨基酸序列与 Egr-1 多肽及其变体或衍生物的部分 (而不是全部) 氨基酸序列完全相同的多肽。



在本发明的这一方面也优选的是其结构和功能特性属于在本发明的治疗中有用的多肽的片段。在这一点上，本发明中优选的实施例是含有本发明中的多肽的以下片段： α -螺旋和形成 α -螺旋的区域、 β -片层和形成 β -片层的区域、转角和形成转角的区域、卷曲和形成卷曲的区域、亲水区域、疏水区域、 α 两性区域、 β 两性区域、柔性区域、表面形成区域、底物结合区域、和本发明多肽的高抗原性指数区域，及这些片段的组合。

优选的区域是调节本发明中多肽的活性的区域。在这一点上最优选的是具有本发明中的多肽的化学、生物或其它活性的片段，包括具有类似的活性或提高的活性，或具有降低了的所不希望的活性的片段。进一步优选的多肽片段是包括或含有在某一哺乳动物(尤其是在人类)体内的抗原或免疫原决定簇的片段。

应该理解的是本发明也涉及，尤其是，编码上述片段的多聚核苷酸、与编码该片段的多聚核苷酸杂交的多聚核苷酸，尤其是在严格条件下杂交的多聚核苷酸，以及，如 PCR 引物，用于扩增编码该片段的多聚核苷酸。在这一点上，优选的多聚核苷酸是与如以上所描述的优选的片段相应的多聚核苷酸。

本发明这一方面的进一步实施例包括其在生物学、预防学、临床医学或治疗学上有用的变体、类似物或衍生物、或片段，包括变体、类似物和衍生物的片段及含有相同片段的组合物。生物活性变体、类似物和片段包括在本发明的范围之内。

本发明也涉及含有以上所描述的多聚核苷酸或多肽的组合物。因

此，本发明中的多聚核苷酸或多肽可以与治疗上可接受的载体或多种载体结合使用。

这些载体可以包括，但不局限于，盐溶液、缓冲盐溶液、葡萄糖、水、甘油、乙醇和它们的组合。

- 5 多肽和多聚核苷酸在本发明中可以单独或与其它化合物(如治疗化合物)结合使用。

这些药用组合物能够以任何有效、方便的方式有效地施用到靶伤口位点，包括，如，尤其是通过局部、静脉内、肌肉内、鼻内或真皮内的途径施用。通常，这些组分可以在原位应用于受伤或相关症状。

- 10 在治疗中或作为一种预防药物，该活性药剂可以以一种可注射的组合物施用给患者，如作为一种无菌的水分散体，优选的是等渗的。

- 可选地，该组合物可以被配制用于局部使用，如以软膏、乳膏、外用药水、眼药膏、滴眼药、滴耳剂、嗽口水、浸渍的敷料和缝合及气溶胶的形式，也可以含有适当的传统添加剂，包括，如，防腐剂，
15 辅助药物渗入的溶剂，以及在软膏和乳膏中的软化剂。这种局部的制剂也可以含有适当的传统载体，如乳膏或软膏基质，及乙醇或油醇用于洗涤。这些载体可以组成制剂质量的大约 1%至大约 98%；更通常的是它们将构成制剂质量的 80%。

- 为了施用到哺乳动物，尤其是人类，期望的是活性药剂的日剂量
20 水平从大约 0.01 毫克/千克到 10 毫克/千克，代表性的是大约 1 毫克/千克。内科医生在任何情况下将确定最适于某患者的确切剂量，这将依据特定患者的年龄、体重和应答而不同。以上剂量是可模仿的平均情况。当然，存在个别病例中需要较高或较低的剂量范围，这在本发明的范围之内。

- 25 作为第九个方面，提供了一种含有 Egr-1 转录因子或含有编码 Egr-1 的序列的核酸分子及其一种或多种治疗上可接受的载体的药剂组合物。

- 使用转录因子在加速伤口愈合上的治疗优越性在于多个促进加速愈合的靶基因的活化。Egr-1 在响应受伤中天然活化，并且增强该天然
30 应答也是有利的。该治疗是以 DNA 为基础的，其提供了一种可靠且可再现的传递系统。

当一种 Egr-1 多聚核苷酸被用于本发明的治疗方法中时，该多聚

核苷酸可以作为一种表达构建物的部分使用，如以一种表达载体的形式。在这种方法中，该构建物被引入到受伤位点，Egr-1 在该处原位产生。这些所使用的构建物可以是标准的载体和/或基因传递系统，如脂质体、受体调节的传递系统和病毒载体。

5 本发明适于伤口愈合的所有方面，包括在糖尿病和末梢动脉闭塞病中的四肢溃疡、手术后疤痕、烧伤和牛皮癣。

如以上所描述的，本发明中的 Egr-1 多肽或核酸可以通过任何简便的方法原位施用到组织损伤的位点，如通过局部施用。一种传递核酸产物的方法是使用基因枪技术，其中 Egr-1 分离的核酸分子，如，
10 以 cDNA 的形式或在一个表达载体内，被固定在金颗粒上并直接射入受伤位点。因此，作为本发明的一个优选的方面，提供了一种含有编码 Egr-1 的序列的核酸分子在基因枪内的使用，以用于治疗伤口。而且，提供了一种适于基因枪治疗的组合物，其包括一种编码 Egr-1 转录因子的序列和金颗粒。

15 然而传递本发明中的核酸或多肽优选的是通过如美国 5,697,901 中所描述的微量接种的方法。

如以上所提到的，包括一段编码 Egr-1 或其生物活性片段的序列的多聚核苷酸，可以在至少一部分天然 Egr-1 启动子(优选的是人 Egr-1 启动子)的控制之下。

20 鼠 Egr-1 启动子已经被分离并测序(Morris, 核酸研究, 16:8835-3346)。潜在的调控序列包括在-26 到-22 位上的一段 AAATA 因子(一种“TATA”样的类似物); 在-337 到-333 位上的一段 CCAAT 盒子; 在-110 到-91、-342 到-324、-358 到-339、-374 到-355 及-412 到-393 位上的五个血清应答因子(SRE); 在-610 到-603 及-867
25 到-860 位上的两个 Ap1 位点; 在-285 到-280、-649 到-644、-700 到-695 及-719 到-714 位上的四个 Sp1 位点; 以及在-138 到-131 和-631 到-624 位上的两个 cAMP 应答因子。Egr-1 已经表现出与鼠 Egr-1 启动子结合及减量调节其自身表达的转录。该启动子的序列在附图的图 9 中列出。

30 关于人类 Egr-1 启动子的调控了解较少。已经提供了一种可能的人类 Egr-1 序列。将 mRNA 起始位点视为 +1，已经鉴定出上游序列的 695 个核苷酸。这段上游序列包括一个在-26 到-22 位的 AAATA 因子(一

种“TATA”样的类似物), 以及多个潜在的调控因子, 包括-505 到-499 位和-647 到-642 位的两个 Sp1 位点; 在-134 到-127 位和-630 到-623 位的两个环化 AMP 应答因子; 在-108 到-89、-344 到-326、-359 到-340、-376 到-357 和-410 到-394 位的五个血清应答因子; 在-597 到-589 的一个 Egr-1 结合位点 (EBS) 以及在-609 到-602 位的一个十四烷酰佛波乙酯 (TPA) 应答因子 (Ap1 结合位点)。已知 TPA 结合位点是有功能的, 因为 TPA 刺激质粒表达氯霉素乙酰基转移酶基因。SRES3 和 4 已经表现出调节 Egr-1 启动子对切变应力的应答, 并且可以将切变应力应答传给 SV40 启动子。从人启动子因子中删除 EBS 导致该启动子切变应力应答的增强, 由此支持了 Egr-1 在减量调节人启动子活性中的作用。

本发明人也发现已发表的有关人 Egr-1 启动子的序列是不正确的, 并且提供了一种与上述已发表的序列具有多处区别的新的序列。这些序列的区别是无法提前预知的, 并且至少其中有一部分被认为是功能上重要的。而且, 本发明者们已经提供了一段完整的序列, 然而所报道的人 Egr-1 启动子序列包括多个缺口。

因此, 包括编码 Egr-1 或其一段生物活性片段的序列的核酸分子可以与一段核酸序列操作性连接, 该序列:

a) 具有一段含有图 7 中所提供的 GW SEQ 序列的链; 或者

b) 相对 GW SEQ 而言, 具有包括一个或多个删除、插入和/或替代的链, 但是其不含有图 7 中作为 ON SEQ 显示的序列, 以及其也不含有图 9 中所显示的序列; 或者

根据本发明的第十个方面, 提供了一段核酸分子:

a) 具有一段含有图 7 中所提供的 GW SEQ 序列的链; 或者

b) 相对 GW SEQ 而言, 具有包括一个或多个删除、插入和/或替代的链, 但是其不含有图 7 中作为 ON SEQ 显示的序列, 以及其也不含有图 9 中所显示的序列; 或者

c) 具有与以上 a) 或 b) 中所描述的链杂交的链。

在以上 a)、b) 或 c) 范围内的分子在此将被更详细的描述:

a) 一种具有图 7 中所提供的 GW SEQ 序列的核酸分子

可以发现图 7 中所显示的 GW SEQ 基因具有多个盒子区域。这些被

认为是功能上重要的。不受理论的束缚，图 7 中所显示的多个盒子区域的可能的功能如以下所描述：

Sp1 (两个区域)

Sp1 表示一段结合转录因子 Sp1 及其同系物的序列。

5

cAMP RE(两个区域)

cAMP RE 表示一段结合转录因子 ATF 及其同系物的序列。该过程由 cAMP 诱导，因此该序列称成为 cAMP 应答因子。

TPA RE

10 TPA RE 表示一段结合转录因子 AP1 及其同系物的序列。该过程是由，如，佛波酯 TPA 诱导，因此该序列被称为一种 TPA 应答因子。

EBS

EBS 表示一段结合转录因子 Egr-1 及其同系物的序列。

SRE (SRE5、SRE4、SRE3、SRE2、SRE1)

15 SRE 表示一段提供了血清应答的序列(即血清应答因子)。以及相关的 Ets(E26 转化特异性)结合位点血清应答因子结合转录因子，如 SRF、ELK-1 和/或 F-ACT1，以及它们的同系物。

TATA

20 TATA 盒子被认为是转录复合物的组合组装所需要的，其包括多个转录起始所需要的转录因子。其不需要包括准确的“TATA”序列，因为其是一个共有序列，并且可以发生一定程度的变化。

GW SEQ 具有多个与已发表的人 Egr-1 序列(此处指定为“ON SEQ”)相关的序列差别。此处该区别在关于图 7 中所显示的序列 GW SEQ 和 ON SEQ 的对齐中进行讨论。

25 从图 7 中可以看出，GW SEQ 中有五个核苷酸相对于 ON SEQ 中相应位置上所提供的特定核苷酸有变化。这些可以被看作是与 ON SEQ 相关的替换。其中两个存在于盒子内的区域。两个替换是用一个 T 替换一个 G 以及用一个 C 替换一个 G。它们分别存在于第一个 cAMP RE 盒子和 SRE3 盒子。

30 相对 ON SEQ 而言，GW SEQ 也具有多个附加的核苷酸(即不是特定鉴定存在于 ON SEQ 内的核苷酸)。这些可以被认作是相对 ON SEQ 的插入。其中的四个存在于 SRE5 盒子内。(其中有三个是 A 的插入和一个 C 的插入。)

相对 ON SEQ 而言, GW SEQ 具有一个删除。是 G 的删除。它不存在于盒子区域内。其位于第二个 Sp1 盒子和 SRE5 盒子之间。

在以上 a) 的范围内的分子当然可能具有相对 GW SEQ 的附加的上游和/或下游序列。例如, 可能提供一个或多个涉及其转录/翻译或调控的区域。也可能提供一个编码区域(优选的是编码 Egr-1 或其一段生物活性片段)。附加区域在以后有更详细的讨论。

b) 一段核酸分子, 相对 GW SEQ 而言, 其具有一段包括一个或多个删除、插入和/或替换的链, 但其不包括图 7 中作为 ON SEQ 显示的序列以及不包括图 9 中所显示的序列

10 可以使得 GW SEQ 的分子的核苷酸序列发生改变, 以提供其它仍然有用的分子。

这些变化在本发明的范围之内。它们包括等位基因和非等位基因的变体。

15 在以上 b) 的范围之内的变体优选的是通常包含一个或多个调控区域, 这些区域具有的功能与 GW SEQ 中显示的一个或多个盒子区域的功能相应(即使该功能是相对 GW SEQ 中所显示的一个或多个盒子区域的增量调节或减量调节)。最优的, 这些分子将具有一个或多个与 GW SEQ 中所显示的一个或多个盒子区域具有相同序列的区域。

20 在以上 b) 范围内的理想的变体, 是其与上述 GW SEQ 的全长或其部分在全部或部分上述 GW SEQ 基本上相同的序列。

25 如果某一变体具有一个或多个相应于图 7 中所显示的 GW SEQ 的一个或多个盒子区域的区域, 则优选的是与上述盒子区域没有区别或仅有少量这种区别(如, 其通常优选的是与某一给定的盒子区域最多具有 1、2 或 3 个区别)。在盒子区域之外可能存在更多序列的变化。因此, 至于不在图 7 中的盒子内的区域, 变体与 GW SEQ 中的相应部分可能具有相对低程度的序列同一性。事实上, 一些变体可能不具有一个或多个相应于 GW SEQ 中上述盒子区域之外的一个或多个区域的区域。

30 本发明的第十个方面中的优选的核酸分子将包括一个或多个调控区域, 这些区域在体内条件下可以改变 Egr-1 在哺乳动物(最优的是在人类)体内的转录水平。因此, 这些核酸分子可以被施用到哺乳动物以允许其表达在转录水平被调控的方式来提供 Egr-1(因此这些

核酸分子通常将包括一段编码一种具有 Egr-1 活性的物质的区域)。

可以存在一个或多个血清应答因子(SRE)。理想的是它们中间的一个或多个将是切变应力应答因子(SSRE)。这些区域能对转录产生切变应力应答。

- 5 多个 SSRE 可能协同作用以促进切变应力应答。理想的是它们与一个或多个 Ets 位点相关或包括一个或多个 Ets 位点。然而, 在一些情况下, 有可能仅需要 SSRE(优选的是与一个 Ets 位点一起)来提供一定程度的切变应力应答。

- 10 一种优选的 SSRE 在图 7 中作为“GW SEQ”的 SRE5 显示。本发明者们已经证明其是具有功能的, 然而在 ON SEQ 中所显示的 SRE5 序列是没有功能的。SRE5 本身, 以及可以提供切变应力应答的 SRE5 变体在本发明的范围之内。这些变体优选的是包括存在 GW SEQ5 中、与 ON SEQ SRE5 之间的至少一个核苷酸的区别。

- 15 其它优选的 SSRE 是图 7 中的 GW SEQ 所显示的 SRE3 和 SRE4, 以及它们的可以提供切变应力应答的变体。

最优选的, 所有三个 SRE3、SRE4 和 SRE5(或其可以提供切变应力应答的变体)均存在。

- 20 无论是否存在特定的 SRE, 本发明第十个方面中的一种核酸分子理想的是将包括一个 TATA 盒子(其不必需包含共有序列“TATA”)。该分子通常也包括一个 CCAAT 盒子(其不必需包含共有序列“CCAAT”)。

通常也将存在至少一个, 优选的是两个 Sp1 结合区域。Sp1 结合区域可以是图 7 所显示的 GW SEQ 的 Sp1 结合序列的任一个或两个。

- 25 可能存在一段 cAMP 应答区域。这些区域优选的是包括图 7 中所显示的具有关于 GW SEQ 的指定为 cAMP RE 的序列。最优选的是图 7 中所显示的 GW SEQ 的第一个 cAMP RE。它们可以使得转录受 cAMP 调控。

- 30 可能存在一个 Egr-1 结合位点(EBS)。其被认为一旦 Egr-1 的水平超过了一个特定的界限, 则起到减量调节 Egr-1 转录的重要作用。因此, Egr-1 可以在切变应力刺激之后限制其自身的表达。如果一个 EBS 对于以这种方式限制 Egr-1 的水平是理想的, 则其通常被包括在内。该 EBS 可能具有图中作为 EBS 列出的 7GW SEQ 序列。可以对一种给定的 EBS 进行核酸的改变以提供它的变体。例如, 所提供的变体可

以提供与图 7GW SEQ 中所显示的 EBS 相比, 对 Egr-1 的亲合力降低。一种这样的变体是如图 8 中所显示的 EBS。在一些情况下, 可能不存在一种功能的 EB, 因此通过 Egr-1 的调控可能完全消除(如可以制造一种 EBS 的完全删除)。也可以对一种 EBS 进行核苷酸改变以提供对 Egr-1 的亲合力提高。如果需要提高 Egr-1 表达的自我调控, 这将是 5 有用的。

c) 一种所具有的链与以上 a)或 b)中所描述的链杂交的核酸分子 可以与以上所讨论的一种或多种核酸分子杂交的核酸分子也包括 10 在本发明的第十个方面内。这些核酸分子在本说明书中作为“杂交”核酸分子提到。理想的是, 本发明中的杂交分子全长具有至少 10 个核苷酸, 优选的是全长具有至少 25 个、至少 50 个、至少 100 个、或至少 200 个核苷酸。

本发明中的杂交核酸分子的全长可能与以上 a)或 b)的范围之内 15 的核酸分子的互补核酸分子具有高度的序列同一性(如至少 50%、至少 75%、至少 90%、至少 95%、或至少 98%的同一性), 虽然这不是必需的。一段给定的单链核酸分子和另一段单链核酸分子之间的序列同一性程度越高, 其越有可能在合适的条件下与另一种单链核酸分子的互补单链核酸分子杂交。

20 优选的杂交分子在中等或高度严格的条件下杂交。杂交条件的详细讨论在 Sambrook 等, 分子克隆: 实验室手册, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 的第 1101-1110 和 1145-1161 页。一种可以使用的杂交条件的例子包括使用一种预洗溶液 5 x SSC、0.5%SDS、1.0 mM EDTA(pH8.0), 并在 25 55°C 下使用 5 x SSV 尝试杂交过夜。然而, 存在许多其它的可能条件。例如, 其中一些列于 W098/45435 中的表 1(见尤其是在该表中的 A-F 下所列出的条件, 次优选的是在 G 到 L 或 M 到 R 所列出的条件),

30 另外一种途径是确定在给定的条件下具有一定长度的特定完美双链(即没有错配)的 T_m , 然后在这些条件下与该双链中的一条单链尝试杂交, 但是在充分低于 T_m 的温度下进行, 以使得一定范围内的稳定杂交以可接受的速度形成, 同时仍然需要适当程度的杂交特异性。这种双链的 T_m 值能够以经验为主地进行确定, 通过提供双链及逐步升

高温直至达到 T_m 值。该 T_m 值的确定也可以，如通过使用： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (G + C \text{ 部分}) - (600/N)$ ，其中 N 是链的长度(该公式对于 Na^+ 浓度为 1M 或较低、及多聚核苷酸长度为 14 到 70 是适当准确的，但当没有满足这些参数时，该公式较不准确)。

- 5 对于全长大于 200 个核苷酸的核酸分子，在给定的条件下，杂交可以，如，在低于理想杂交(即没有错配) T_m 15 至 20°C 下进行。然而，由于长度降低， T_m 值降低，直至有时在 $T_m - 25^\circ C$ 下进行杂交是不方便的。因此与较短核酸分子的杂交常常在仅低于 T_m 5 到 10°C 下进行。中等或高度严格条件通常将引起小部分的错配。作为单凭经验而做的方法，对于每 1% 的错配， T_m 值降低 1-1.5°C。优选的，选择杂交条件使得错配小于 25%，更优选的是使得错配小于 10% 或小于 5%。在杂交之后可以接着进行提高严格性的清洗。因此，开始的清洗可以在低严格下，但接着就要进行较高严格的清洗，直到达到杂交在其下进行的严格条件。

- 15 杂交条件的上述讨论所提供的只是通常指导，但不具有局限性。因为熟练人员将能够适当变化参数以提供合适的杂交条件，并且能够考虑一些变化，如多聚核苷酸长度，碱基组成，双链的性质(即 DNA/DNA、RNA/RNA 或 DNA/RNA)，离子存在的类型，等等。

- 20 最优选的，本发明第十个方面的杂交核酸分子与具有图 7 中所显示的 GW SEQ 序列的 DNA 分子杂交，或者与图 7 中所显示的一个或多个盒子区域杂交。

例如，杂交核酸分子可以作为探针或引物使用。

- 25 探针可以被用于纯化和/或鉴定核酸。它们可以用于诊断。例如，探针可以被用于确定某一患者是否在其基因组中具有可能影响 Egr-1 的转录或该转录的调控的缺陷。这些缺陷可能使患者具有患多种病症的倾向，这可以使用本发明中的治疗方法进行治疗。例如，伤口愈合可以通过一个或多个 SRE 上的突变被损害。这些突变可以通过使用探针进行鉴定，这些探针与 GW SEQ 中所显示的一个或多个 SRE 杂交的特异性程度高于与突变 SRE 杂交的特异性(或反之亦然)。

- 30 理想的是，本发明第十个方面的杂交分子与具有图 7 中所显示的 GW SEQ 序列或其一个或多个盒子区域的 DNA 分子之间的杂交，其严格性高于和具有图 7 中所显示的 ON SEQ 序列或其一个或多个盒子区域

的 DNA 分子之间的杂交。例如，可以设计杂交分子对图 7 中所显示的 GW SEQ 的 SRE3、SRE5 和 cAMP 区域中的一个或多个具有高度的特异性(所有这些区域在序列上与 ON SEQ 中的相应区域存在区别)。

5 在本发明的第十个方面范围之内的杂交核酸分子包括引物。引物在扩增核酸分子或其部分中是有用的，如通过 PCR 技术。

除了作为探针或引物有用之外，本发明第十个方面中的核酸分子可以用作反义分子来改变表达。该技术被用于反义治疗。反义分子可以被用于，如通过阻止或降低转录水平来阻断或降低 Egr-1 的表达。可选地，它们可以被用于通过结合调控 Egr-1 转录的调节子通常结合的区域，来阻止或降低该调节子对于 Egr-1 转录的调控。

重要的是需要注意用于本发明中的核酸分子不仅包括具有经典的 DNA 或 RNA 结构的分子，而且包括具有修饰(非磷酸二酯)的变体主链，如吗啉衍生物和肽核酸(PNAs)，其含有一个以 N-(2-氨基乙基)甘氨酸为基础的拟肽主链(见 Nielsen, P.E., *生物物理和生物分子结构年鉴*, 24 167-83 (1995))。具有修饰的主链的核酸变体相对于未修饰的核酸稳定性提高，并且当需要长时间的杂交时(如在反义治疗时)，其是尤其有用的。

从以上的讨论中，应该理解的是很大数量的核酸是在本发明的第十个方面的范围之内的。除非本文另外指明，否则本发明第十个方面中的核酸分子可以因此具有一个或多个以下的特征：

1) 它们可能是以 DNA 或 RNA 的形式存在(包括天然存在的 DNA 或 RNA 结构的变体，其具有非天然存在的碱基及/或非天然存在的主链)。

25 2) 它们可能是单链或双链(一段给定的链及其互补的链均包括在内，不论它们是否相联)。

3) 它们可能是以重组的形式提供，即共价结合到一段异源的 5' 和/或 3' 侧翼序列以提供一种嵌合分子(如载体)，其不是天然存在的。

4) 它们可能没有与通常情况下天然存在的 5' 和/或 3' 侧翼序列一起提供。

30 5) 它们可能是以基本上单纯的形式(如以分离的形式)提供。这可以通过，如使用探针来分离具有一种理想靶基因序列的克隆分子，或者通过使用化学合成的技术合成。因此，该核酸分子可能以基本上没

有污染蛋白和/或其它核酸分子的形式。

6)它们可能以有内含子(如, 作为一段全长的基因)或没有内含子形式提供。

5 本发明第十个方面的各种用途将在此处进行进一步的详细的讨论。

本发明第十个方面的核酸分子可能包含任何理想的编码序列。如, 一个或多个血清应答因子可以与一段编码序列操作性连接, 该编码序列通常是不与这些因子连接的。例如如果需要对一种给定的、由通常不表现血清应答的编码序列编码的治疗制剂提供血清应答, 则其在伤口愈合中是有用的。

然而本发明第十个方面的核酸分子优选的是包括 Egr-1 或其生物活性片段的编码序列。

所希望的是, 本发明第十个方面的核酸分子包括一个启动子区域, 并且可以被用于通过允许 Egr-1 mRNA 的转录来提供 Egr-1。然后其可以通过存在于宿主内的核糖体进行翻译。因此, 核酸分子可以被施用到某一患者(优选的是人类或其它哺乳动物), 使得在该患者体内可以合成附加的 Egr-1, 或者(次优选的)它们可以被用于制备 Egr-1 本身, 然后将该 Egr-1 施用给该患者。

20 本发明第十个方面中用于施用到某一患者的核酸分子优选的是能够以某种方式转录, 以使得该转录可以被一种或多种在该患者体内调节 Egr-1 转录的因子调控。

例如, 可以提供一种或多种 SSRE(如以上所讨论的)以提供具有切变应力应答的 Egr-1 的转录。当本发明第十个方面的核酸分子被施用到某一患者(而不是使用 Egr-1 本身)时, 这是尤其有利的。当本发明第十个方面的核酸分子被用于体内治疗伤口时, 切变应力应答是有利的。这是由于在受伤位点的切变应力应答可以导致因子结合到 SSRE 上, 这可以刺激 Egr-1 转录增强。所得到的 Egr-1 水平的提高可以加速伤口的愈合。

在某些情况下, 可能需要降低切变应力应答水平。例如, 可能需要通过这种方法降低伤口的治疗速度(可能是为了减少疤痕)。另外, 可能需要降低与切变应力应答相关的心血管问题的危险。

本发明的第十方面还可用于这里。它首次提供了与人 Egr-1 转录

调控相关的五个人 SREs 的完整序列。可以对这些序列中的一种或多种进行突变，以便相对用图 7 所示 GW SEQ 的一个或多个 SREs 可获得的切变应力应答水平而言，降低该应答的水平。

在另一些情况下，可能需要通过在五个 SRE 中的一个或多个上提供突变来提高切变应力应答的水平，目的是提高与使用图 7 GW SEQ 中所显示的 SRE 可得到的应答相关的切变应力应答的水平。这些突变可能如在加速伤口的愈合中是有用的。

本发明第十个方面的核酸分子可能以载体的形式存在，虽然这不是必要的。它们可能通过物理的方法施用到某一患者体内。这些方法包括局部施用在一种适当的媒介物内的“裸露的”核酸载体—如在治疗上可接受的赋形剂的溶液中，如磷酸缓冲盐溶液(PBS)。这些方法包括颗粒轰击(这也即是已知的“基因枪”技术，在 US-5371015 中被描述)。在本说明书中，惰性颗粒，如用核酸包裹的金颗粒通过高压下从一种发射装置中放出，以足够的速度被加速，使得它们可以穿过受伤部位表面(如皮肤)(用本发明中的核酸分子包裹的颗粒在本发明的范围之内，以及含有这些颗粒的装置)。其它将 DNA 直接施用到某一受体体内的物理方法包括超声、电穿孔、电穿孔和微量接种。尤其优选的是微量接种的传递模式。其描述在 US-5697901 中。

本发明第十个方面的核酸分子也可以通过特定的传递载体被施用。

可以使用任何适于基因治疗的载体。基因治疗方法的讨论如，由 Verna 等，在自然 389: 239-242 中所披露的。病毒及非病毒系统均可以使用。

以病毒为基础的系统包括以逆转录酶病毒、慢病毒、腺病毒、腺病毒相关的病毒、疱疹病毒和牛痘病毒为基础的系统。

非病毒基系统包括直接施用以核酸和脂质体为基础的系统。

本发明第十个方面的核酸序列甚至可以通过转化宿主细胞的方式被施用。这些细胞包括从患者体内收集到的细胞。本发明中的核酸分子可以在体外被引入到这种细胞内，然后将该转化的细胞返回到该患者体内。该核酸分子不需要被作为载体引入，因为可以引入非载体核酸分子。一些这样的分子可以通过同源重组，整合到已经存在于宿主细胞内的核酸中。

本发明也包括可以用于提供多肽(如 Egr-1)的表达系统。然后将这些多肽用于治疗。

5 优选的表达载体是真核载体。然而也可以使用原核载体。合适的载体通常将包括一段与一个或多个调控序列操作性连接的编码序列。优选地, 该编码序列编码 Egr-1。

许多不同的表达系统是已知的并且在, 如 Sambrook 等 (分子克隆, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 中被讨论。

10 从以上的讨论中应该理解的是本发明第十个方面的核酸(其可能以载体的形式存在)可以在多种治疗应用中被使用, 以及可以使用这种核酸来产生多肽。因此本发明包括含有上述核酸或多肽的治疗上可接受的组合物, 该组合物与一种或多种治疗上可接受的载体选择性地组合。

15 这些载体可能包括, 但不局限于盐溶液、缓冲盐溶液、葡萄糖、水、甘油、乙醇及它们的组合。

多肽和核酸在本发明中可以单独或其它物质(如治疗物质)结合使用。例如, 在特定环境下(如, 需要使疤痕最小、阻止再狭窄(resteriosis)、调节血管壁钙化和/或抑制细胞增殖(如在癌症中))可以施用 Egr-1 抑制剂(如 NAB1 和/或 NAB2)。当需要使用两种或多

20 种活性制剂时, 其作为组合制剂进行同时、分别或连续使用。

本发明中的药剂组合物可以以任何有效的方式施用, 包括, 如, 尤其是通过局部、静脉内、肌肉内、鼻内或皮下途径使用。通常优选的是该组合物可以局部使用, 如在受伤位点或其相关症状的位点上或其附近使用。然而可以采用系统性施用。

25 一种活性制剂可以作为一种注射性组合物(如作为一种无菌的水性分散体)施用到某一患者体内。其优选的是与某一受体的体液基本上等渗。

30 可选地, 该组合物可以被配制用于局部使用, 如以软膏、乳膏、外用药水、眼药膏、滴眼药、滴耳剂、嗽口水、浸渍敷料和缝合及气溶胶的形式使用。其可以含有添加剂, 包括, 如防腐剂、辅助药物渗透的溶剂、以及在软膏和乳膏中的软化剂。这种局部制剂也可以含有兼容性的载体, 如乳膏或软膏基质, 以及用于外用药水的乙醇或油

醇。这些载体可以构成制剂质量的大约 1% 到大约 98%。更通常的它们将构成制剂质量的 80%。

最优选的，含有本发明中的核酸的药剂组合物适于通过“基因枪”技术施用。因此，该核酸可以与能够作为发射体使用的颗粒（如金颗粒）结合。

为了施用到哺乳动物，尤其是人类，希望的是一种活性制剂的日剂量水平将为从 0.01 毫克/千克到 10 毫克/千克，典型的是大约 1 毫克/千克。在实践上，一个内科医生将确定最适于某一患者的确切剂量，这一剂量可以依据特定患者的年龄、体重和状况而有很大不同变。如果产生副作用，可以依据良好的临床实践降低剂量。

除了治疗作用之外，本发明也可以被用于诊断。如以上所讨论的，本发明提供了可以被用于诊断不同病症的探针。它们可以作为诊断试剂盒的部分被提供，该试剂盒可能包括其它组分—如一种或多种清洗液体、检测杂交的装置、使用的指导，等。该探针可以用一种可检测的标记进行标记（如，荧光标记或放射标记）。

本发明可以被用于筛选。例如，本发明第十个方面的核酸分子（如一种含有图 7 所示 GW SEQ 或其部分的分子）可以被用于筛选与其结合的物质。可以对这些物质进行分析来看它们是否会影响 Egr-1 的转录。因此它们可能在以上所讨论的设计治疗药物中是有用的。可选地，本发明第十个方面的核酸分子可以被用于筛选能够阻断另一种物质与该核酸分子结合的物质。如果另一种物质是 Egr-1 转录的调控子，阻断上述结合的物质也能够用于设计以上所讨论的一种或多种治疗的药物。

本发明可以被用于研究，如在研究凭借什么来制造一个或多个与给定的核酸分子相关的改变时，本发明第十个方面的核酸分子可以作为一个起点。这可以被用作确定该分子的哪个部分在 Egr-1 的转录中是重要的，或者在调控这种转录中是重要的。如可以制造与图 7 中所显示的 GW SEQ 的一个或多个盒子区域相关的插入/删除/替换，并且可以调整这些插入/删除/替换的影响。可以制造变化来设法鉴定可以使 Egr-1 转录水平提高或降低的核酸分子。

本发明每个方面的优选的特征相互作为其它方面的必要的变用。本说明书中所提到的现有技术文件在法律准许的最大范围内，结合在

本说明书中。

下面将参考附图仅以举例形式对本发明进行描述，其中：

图 1a 和 b 表示 VEGF 的 Egr-1 表达；

图 1c 和 d 表示 TGF-B1 的 Egr-1 表达；

5 图 1e 和 f 表示 PDGF A 的 Egr-1 表达。

图 2a 表示 Egr-1 对大鼠切除伤口收敛的影响；

图 2b 表示 Egr-1 DNA 转染对愈合的大鼠切除伤口的组织学影响；

图 2c 表示 Egr-1 对大鼠切除伤口中胶原蛋白沉积的影响；

10 图 2d 表示使用 vWF 免疫染色得到的 Egr-1 对大鼠切除伤口中的血管生成形式的影响；

图 3a 表示使用 Mirus TransLT(Cambridge Bioseciences)，将 pGL3 荧光素酶对照质粒转染到血管生成共培养系统中的脂质：DNA 比例 (v/w) 的最优化。

图 3b 表示 Egr-1 对血管生成的影响；

15 图 4a 表示使用 western 印迹分析得到的样品对骨负荷*影响；

图 4b 表示在负荷之后对人 TE85 骨细胞内的 Egr-1 蛋白进行的 western 印迹分析；

图 4c 表示在负荷之后对 TE85 骨细胞产生的 PDGF BB 进行的 ELISA 分析；

20 图 4d 表示在将 CMV-TGF-B1 转染到 ROS 细胞内之后对 VEGF 和 TGF-B1 的检测；

图 4e 表示在将 CMV-TGF-B1 转染 MC3tE1 细胞之后对 VEGF 和 TGF-B1 的检测；

25 图 5 表示在异位骨形成的鼠模型中，Egr-1 对其中碱性磷酸酶水平的影响；

图 6a 表示对用 CMV Egr-1 转染的人平滑肌细胞的抗 Egr-1 抗体染色；

图 6b 表示对用 CMV Egr-1 DNA 转染的猪的平滑肌细胞的抗 Egr-1 抗体染色；

30 图 6c 表示通过 Fugene 将 pGL3 荧光素酶对照质粒对人 SMC 的最优转染；

图 6d 表示通过 Fugene 将 pGL3 荧光素酶对照质粒对猪 SMC 的最

优转染；

图 6e 表示通过将 CMV-Egr-1 转染到人 SMC 对 VEGF 产生/分泌的活化；

图 6f 表示通过将 CMV-Egr-1 转染到人 SMC 对 HGF 产生/分泌的活化；

图 6g 表示通过将 CMV-Egr-1 转染到人 SMC 对 PDGF 产生/分泌的活化；

图 6h 表示在受伤之前和之后 Egr-1 蛋白在血管壁内的免疫染色；

图 7 表示分别表示为 GW SEQ 和 ON SEQ 的两段核酸序列的比较。

ON SEQ 是已发表的早期生长应答-1 启动子 (Sakamoto 等, 癌基因 6; 867-871, 1991), GW SEQ 是本发明的一种序列, 其含有多种如所显示的碱基插入/删除及替换(黑体下划线)。

图 8 表示图 7 中所显示的序列的一种变体, 该变体在 Egr-1 结合位点(EBS)中具有一个修饰的 EBS 区域突变, 如黑体下划线所示。

图 9 表示小鼠 Egr-1 基因中已发表的 5' 上游序列 (Morris, 核酸研究 16: 8835-8846)。该核苷酸从加帽位点=+1 处开始编号。假定的 TATA 和 CCAAT 因子包括在盒子内。下划线为潜在的调控因子, 并在图中标明。点下划线表示用于引物延伸研究的 29-聚体；

图 10 表示通过 pFA-MEK1 瞬时转染活化 SRE5。

实施例

实施例 1 和 2 描述了基因枪传递与金颗粒复合的 β -半乳糖苷酶和 Egr-1 表达质粒 DNA, 传递到啮齿类的皮肤。

a) 管道装置的制备

造管制备装置设置在一个无菌的气体层流橱柜内, 用 70% 的 I. M. S 擦洗并在橱柜内风干。将从氮气罐至管道制备装置之间的气体线性管道高压灭菌, 并加上一个 Gelman 同轴的 0.2 微米滤膜。将灭过菌的管道和制备装置中的气体入口通过一个 luer 锁定连接器连接起来, 并使气体以 0.2 升/分钟流过以使管道完全干燥。

将颗粒发送管道与制备装置连接, 并使气体如以上流过以使管道内部完全干燥。在管道内任何残留的湿气都将导致金颗粒与管壁的不

良或不均匀接触，这可能会对任何实验的结果产生不利影响。

b) DNA-金微载体颗粒的制备:

1.0 微米的金颗粒购自 Bio-Rad UK。称量一份分装的金颗粒 (53 毫克) 装入一个微量离心管中，加入 100 微升 0.05M 亚精胺并轻轻震荡该管。

加入 100 微升含有 100-120 微克表达 Egr-1 或 β -半乳糖苷酶的质粒 DNA 的 DNA 溶液，然后边震荡边加入 100 微升 1M CaCl₂。将该混合物在室温下静置 10 分钟，然后离心沉淀。去掉上清液并用无水乙醇将金颗粒洗三次。

最后将金颗粒重悬在含有 0.1 毫克/毫升聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 的无水乙醇中。

估计 DNA 包裹到金微颗粒上的效率，然后释放到水分散相中：所有样品 (起始物质、DNA/金颗粒复合物形成之后的沉淀后上清液、以及洗脱的物质) 均在 “GeneQuant” (Pharmacia) 内进行 DNA 分析。残留的沉淀后 DNA 给出了未结合物质的估计，并认为结合：起始物质的比例是包裹效率。

c) 将 DNA/微载体上清液装入金传送管道内:

然后使用注射器将在乙醇/PVP 中的金颗粒上清液装入传送管道内，并允许上清液在管道内静置 3-5 分钟。在这段时间内，金颗粒沉淀在管道的内表面，使得乙醇可以通过注射器被除去。当乙醇被除去时，旋转管道使金颗粒均匀分散在管道的内表面上。旋转 2-3 分钟之后，将氮气以 0.1 升/分钟的速度通过管道以除去残留的乙醇并使金颗粒黏附。10 分钟之后，移去管道，使用 (Bio-Rad UK) 提供的切割器将其切成适当的长度，并将切割后的管道装入基因枪内。

使用商业上可供的检测 Egr-1 的抗体制剂 (Santa Cruz)，采用常规的免疫组化确定 Egr-1 的表达和活性，并在 1-7 天内监测 Egr-1 靶基因产物 (Santa Cruz 或 R&D 系统) 和表达。阴性对照是无效的 DNA。

实施例 1

Egr-1DNA 传递到未受伤的啮齿类皮肤

1.1 方法

通过基因枪调节的颗粒传送, 将一种包括 Egr-1 cDNA、由人巨细胞病毒启动子(hCMV; Houston 等, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19; 281-289, 1999)驱动的表达质粒传递到未受伤小鼠的背部。金/DNA 复合物的制备如以上所描述, 使用基因枪的压力为 350psi, 金颗粒的大小为 1.6 微米, 每只动物发送 0.5-1.0 微克 DNA。在发送 DNA 的 0、1、2 和 6 天之后宰杀动物, 将其皮肤包埋在 OCT 内并在干冰/己烷中速冻。将切片制为 0.7 微米并通过免疫染色、使用抗 VEGF、PDGF A、TGF β 和 Egr-1 的抗体检测 Egr-1 靶生长因子。

1.2 结果

显示出 Egr-1 活化 VEGF(图 1a 和 1b)、TGF β (图 1c 和 1d)、PDGF A(图 1e 和 1f)的免疫组化数据。结果表明 VEGF 蛋白在第 1 和第 2 天明显被增量调节, 在第 6 天下降, TGF β 在第 6 天增量调节但不在第 1 和第 2 天, 以及 PDGF A 在 Egr-1DNA 传递 2 小时以后迅速增量调节(标为 0 天)。

1.3 结论

这些数据证明 Egr-1 在体内可以活化靶生长因子的表达, 其中一些在本说明书中被描述。这些数据说明 Egr-1 活化生长因子发生在在时间上分开的时间段内。

在使用未受伤的啮齿类皮肤已经确证了 Egr-1 靶基因的活化(实施例 1)之后, 则进行切除的大鼠伤口的 Egr-1 和 β -半乳糖苷酶基因枪传递以鉴定 Egr-1 对伤口愈合速度的影响。

实施例 2

使用 Egr-1 转录因子以在啮齿类中促进伤口修复

2.1 方法

2.1.1 质粒构建:

在本研究中使用的表达质粒是 CMV 启动的 β -半乳糖苷酶和 CMV 启

动的 Egr-1 (Houston 等, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol, 19; 281-289, 1999)。质粒在大肠杆菌 XL-2 Blue MR 中扩增, DNA 使用 Qiagen maxi 试剂盒制备。

5 2.1.2 颗粒调节的基因转移:

将 18 只体重为 250 克的雄性 Sprague Dawley 大鼠在氧气/氮氧化物为 2: 1 的混合气体中, 使用异氟烷麻醉。在大鼠背部的两个转染位点(距头部 8 厘米, 脊柱两侧各 1.5 厘米)的准备首先是剪去皮毛, 然后用剃刀削净。在各受伤位点进行两次转染, 间隔 8 毫米, 通过
10 将 Egr-1 或 β -半乳糖苷酶的质粒/金复合物以 350 psi 加速到皮肤内。每次转染总的 DNA 量不少于 1.7 微克(平均每个伤口 3.4 微克)

2.1.3 切除伤口的愈合模式:

转染后 24 小时麻醉动物, 在转染的准确位点用生检刀制造两个全
15 层切除伤口(直径 8 毫米)。受伤之后迅速用照相机/录象设备记录各伤口, 并使动物从麻醉中苏醒。在受伤的 2、4 和 6 天之后宰杀 6 只动物并同样用相同的照相机/录象设备记录各伤口。记录之后, 切开伤口并收集以进行常规的组织学和免疫组织化学。

20 2.1.4 愈合分析:

i) 宏观鉴定

使用图象分析确定受伤区域, 愈合表现为初始受伤区域的百分率提高。采用一种成对的 Mann-Whitney 检测来估计处理过的和对照组群之间区别的统计显著性。

25 ii) 微观鉴定

组织学分析:

在解剖之后在每个时间点, 将各伤口水平切开。一半放入 4%多聚
30 甲醛中 24 小时并加工, 以便进行蜡固定组织学分析。使用薄片切片
机从每个伤口切出 5 微米的薄片并用 van Geison 染色薄片。使用这
一组织染色, 鉴定伤口愈合的关键标记, 包括上皮再形成和胶原蛋白
含量, 并在处理过的和对照薄片之间进行比较。

免疫细胞化学

进行免疫细胞化学和图象分析以将使用常规组织学所看到的区别量化。一旦在 OCT 中冷冻, 则使用低温恒温器将各伤口的第二部分切成 7 微米的薄片。将来自各伤口的两个薄片在冰冻的丙酮中固定, 并进行主要是对胶原蛋白 I 和冯·威利布兰德因子 (von Willebrand factor, vWF) 的荧光免疫染色。免疫染色之后迅速将各薄片放在荧光显微镜下并用 $\times 25$ 倍的放大记录受伤面积。整合图象并设定界限以使背景最小化。采用图象分析测定染色的面积和强度并绘出曲线图。使用一种 Man-Whitney 非参数检测来估计处理过的和对照组之间区别的统计学显著性。

2.2 结果

2.2.1 Egr-1 对大鼠切除伤口愈合的影响

15 (i) 伤口收敛

在受伤 6 天以后, 与对照 (β -半乳糖苷酶) 相比, 相应于 Egr-1 转染的直径为 8 毫米的全层大鼠真皮切除伤口在边缘收敛较快。统计学上显著增强 ($p < 0.05$) 的收敛发生在受伤 6 天以后, 其中 Egr-1 处理的伤口收敛后的面积小于对照 7% (图 2a)。

20

(ii) 组织学分析:

在受伤 4 和 6 天以后, 用 van Gieson 染色的伤口切片在伤口的组织学上表现出明显的区别。在受伤 2 天以后, 在 Egr-1 和 β -半乳糖苷酶转染的伤口之间存在很小的区别。两种处理均在受伤位点显示单核细胞, 意味着早期炎性应答, 伴随着早期痂的形成, 但没有上皮再生。在受伤的 4 天以后, 上皮再生成仍然没有开始, 然而用 Egr-1 转染的伤口与 β -半乳糖苷酶相比在受伤位点具有更多的胶原蛋白。在受伤的 6 天以后, 与 β -半乳糖苷酶相比, 用 Egr-1 处理的伤口具有更成熟的肉芽组织, 在受伤位点表现出明显更多的胶原蛋白, 其程度达到在其中可以看到清晰的厚胶原蛋白纤维。与 β -半乳糖苷酶中的 0% 相比, 用 Egr-1 处理的上皮再生成完成了伤口的 50%。在组织学上, 用 Egr-1 处理的伤口与 β -半乳糖苷酶相比, 表现出愈合的加速 (图

30

2b).

(iii)使用免疫组织化学和图象分析对 Egr-1 在胶原蛋白沉积中的影响进行量化:

5 对用 Egr-1 或 β -半乳糖苷酶处理的伤口的 7 微米低温切片进行胶原蛋白 I 免疫染色,并使用图象分析对染色进行量化.与 Egr-1 相比,用 β -半乳糖苷酶处理的伤口在受伤 2 天以后具有明显较多的胶原蛋白.在受伤的 4 和 6 天以后, Egr-1 转染的伤口比对照(β -半乳糖苷酶)具有更多的胶原蛋白沉积,这证明了使用常规的蜡固定组织学方法所看到的发现. Egr-1 转染提高了受伤 4 和 6 天以后胶原蛋白沉积
10 的量(图 2c).

(iv)使用免疫组织化学和图象分析对 Egr-1 在血管生成中的影响进行量化:

15 采用冯·威利布兰德因子对伤口低温切片进行免疫染色和图象分析测定受伤位点处阳性染色的面积,来对血管生成进行量化.在受伤的 2 天以后,与对照(β -半乳糖苷酶)相比, Egr-1 转染的伤口具有明显($p<0.01$)较多的新血管.在受伤的 4 和 6 天以后, Egr-1 和 β -半乳糖苷酶转染的伤口具有类似水平的血管生成.表达 Egr-1 的 DNA 的转染比对照早 2 天促进血管生成(图 2d).
20

2.3 结论

Egr-1 转染大鼠切除伤口通过提高收敛、上皮再生和胶原蛋白沉积的速度来加速愈合. Egr-1 转染也在受伤 2 天以后促进了血管生
25 成.

实施例 3

使用 Egr-1 转录因子促进血管生成

30 3.1 方法

将在 hCMV 启动子控制之下的 Egr-1 (Houston 等, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19; 281-289, 1999)转染到被设计用于在体

外测定血管生成的人细胞共培养系统内。血管生成试剂盒 (TCS Biologicals) 如商家指导所描述的进行使用, 分别采用 VEGF 蛋白 (2 纳克/毫升) 和苏拉明 (20 μ M) 作为血管生成的阳性和阴性对照。

5 采用 pGL3 对照荧光素酶 (Promega) 对共培养系统进行转染的最优化, 同时将 1.0 微克和 0.5 微克 CMV- β gal 作为正规化质粒用作转染对照。采用两种比例的脂质: DNA (v/w); 2:1 和 4:1 (图 3a)。在一个 24 孔的微量滴定板中, CMV Egr-1 DNA 以每孔 0.5、1.0、1.5 和 2.5 微克, 各三孔, 使用 Mirus Transit 试剂 (Cambridge Biosciences) 和 DNA 比例为 2:1 进行转染。向三组重复的孔中加入 VEGF 蛋白阳性
10 对照和苏拉明阴性对照。在共培养 11 天以后, 通过对细胞进行内皮细胞标记 PECAM-1 的染色和使用 BCIP/NBT 底物显象对血管生成进行确定。

记录使用四种剂量的 Egr-1 表达质粒以及 VEGF (阳性对照) 和苏拉明 (阴性对照) 的细管形成的典型图象, 并通过采用 Quantimet 600 影
15 像分析和相关软件的图象分析对其进行加工。

3.2 结果

在共培养 11 天以后, 作为细管形成来描述的血管生成在光学显微镜下是可检测得到的。同全孔的图解一样, 使用图象分析提供血管生
20 成的得分, 结果是以每单位面积的血管与处理比较进行描述的 (图 3b)。

降低的细管形成 (用苏拉明 (suramin) 处理的细胞) 和提高的细管形成 (用 VEGF 蛋白处理的细胞) 被显示。Egr-1 以相反的剂量依赖方式表现出促进增强的细管生成。

25

3.3 结论

在共培养系统中, Egr-1 转录因子表达是血管由来的。这与实施
例 1 中的数据相互支持, 当通过基因枪传递到小鼠皮肤内时 Egr-1 表现出增量调节的生长因子表达 (如 VEGF), 也与实施例 5 中的数据相互
30 支持, 在例 5 中 Egr-1 转染表现出提高 VEGF 在人血管平滑肌细胞中产生的数量。作为一种前血管生成刺激的 Egr-1 的反向剂量应答与实施例 6 中所获得的结果一致, 要指出的是 Egr-1 可能减量调节其自身

的产生(Cao, X. 等, J. Biol. Chem., 268, 16949-16957, 1993; Schwachtgen, J.-L. 等, J., Clin. Invest., 101, 254-2549, 1998)。

5 实施例 4 体外使用 Egr-1 转录因子促进骨发生

4.1 骨负荷和生长因子的鉴定

4.1.1 方法:

10 所使用的细胞为 TE85, 一种人骨肉瘤衍生的造骨细胞样细胞系。胰酶化亚铺满的细胞层并重悬在含有 10%胎牛血清(FCS)和 1%盘尼西林-链霉素(PS)抗生素的 DMEM 中。将细胞悬液接种到负载底物上(18 x 18 毫米正方形的组织培养-处理的塑料)。将细胞置过夜使之附着。一旦附着到负载底物上, 则将细胞转移到装有含 2%FCS 和 1%PS 的 DMEM
15 的烧瓶内, 在负荷刺激之前再培养 24 小时。

现图 4a 中所描述的每个时间点有四套条件:

[1] 负荷(以每秒 3232 微应变*进行 200 个循环的 2000 微应变*)。

[2] 对照(无负荷)。

20 [3] 阳性对照(100 纳克/毫升 PMA 处理 1 小时)。

[4] 溶质对照。

对于细胞负荷, 将细胞从标准的组织培养条件下无菌地转移到负荷仓内。细胞在仓内负荷的持续时间为 4 分钟。负荷之后, 将细胞转回到它们先前的培养条件下。对照处理的细胞以几乎一样的方式处
25 理, 除了不对仓内施加负荷。

通过两种不同的方法分析结果。第一, 在负荷实验之后, 通过 Western 印迹分析细胞团以鉴定 Egr-1 转录因子的存在(图 4b)。第二, 通过 ELISA 分析组织培养基来鉴定所分泌的生长因子的存在(图 4c)。

30

4.1.2 结论:

这些结果显示在骨负荷的条件下, 转录因子 Egr-1 在人骨肉瘤衍

生的造骨细胞样细胞中生成。

对人 TE85 细胞施加骨负荷刺激了生长因子的产生和分泌，其中的一个例子是 PDGF B。

5 4.2 将 CMV TGF- β 1 转染到 MC3T3E1 和 ROS 细胞，接着对细胞培养上清液进行人 TGF- α 1 和小鼠 VEGF 的 ELISA 分析。

4.2.1 材料:

(i) 转染

10 小鼠造骨细胞 (MC3T3E1) 和大鼠骨肉瘤细胞 (ROS17/2.8) 被用于接种到 6 孔培养皿内。

MC3T3E1 细胞在 MEM- α 、最低要求标准的培养基 eagle α 改进 (Sigma)、10%胎牛血清 (Life Technologies)、1%L-谷氨酰胺 (Life Technologies)、1%盘尼西林-链霉素 (Life Technologies) 中培养。

15 ROS 细胞在 F12 HAM、含谷氨酰胺、10%胎牛血清 (Life Technologies)、1%盘尼西林-链霉素 (Life Technologies) 的 F-12 HAM (Life Technologies) 中生长。

20 细胞使用 Fugene (Boehringer Mannheim)、用以上所描述的 (Benn, S.I. 等, J. Clin. Invest., 98; 2894-2902, 1996) CMV TGF- β 1 表达质粒进行转染。转染到细胞内如所描述的进行:

1) 准备一个 6 孔培养皿，每孔 2×10^5 个细胞，放置过夜，直至达到 5-70% 铺满。

2) 第二天，在 6 只 eppendorf 管中各加入 94 微升无血清培养基 (SFM) 和 6 微升 Fugene，在室温下放置 5 分钟。

25 3) 这 6 只分开的管中，其中两只不加 DNA，然而在剩下 4 只管中加入 4 微克 CMV-TGF- β 1 DNA。

4) 将步骤 2) 中的 Fugene/SFM 混合物逐滴加入步骤 3) 中的管内，将管轻弹几次，然后在室温下孵育 15 分钟。

30 5) 将 Fugene/SFM/DNA 转染混合物逐滴加入它们各自的孔内，同时旋转 6 孔培养皿，将培养皿在 37°C 孵育 48 小时。

6) 分装细胞培养上清液并贮存于 -20 °C。

对 MC3-T3E1 细胞和 ROS 细胞进行以上操作。

通过 ELISA (R&D 系统), 使用一种基于链霉亲和素-HRP 的颜色检测系统, 检测到了 TGF- β 1 和 VEGF 在细胞培养上清液中的存在。

4.2.2 结果:

5 在转染 CMV TGF- β 1 之后, TGF- β 1 和 VEGF 的产生和检测在 ROS 细胞 (图 3) 和 MC3T3E1 细胞 (图 4) 中被表示。这些数据表明一种 Egr-1 靶基因, 在本实施例中是 TGF- β 1 已经活化了 VEGF 的产生。

4.3 结论

10 Egr-1 的表达和 Egr-1 靶基因的活化可能协同增强活化 VEGF。

实施例 5

在体内使用 Egr-1 转录因子促进骨生成

15 5.1 大鼠异位的骨形成

在啮齿类中皮下移植可能的骨诱导化合物, 代表了在目前使用中最广泛研究的生物分析系统 (Wozney, J. M., 细胞分子生物学, 131-167, 1993)。一种载体基质的使用增强了骨诱导应答的可再现性和敏感性。在该分析系统中 (Reddi, A. H. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 1601-1605, 1972; Sampath, T. K., *ibid*, 78: 7599-7603, 1981), 该载体基质是来自大鼠长骨的骨干部分, 其已被研磨成特定大小的颗粒, 接着除去矿物质和通过胍抽提去除生物活性。所剩下的载体主要由不具有骨诱导能力的骨胶原蛋白组成。然后通过用酒精沉淀、对水透析或冻干法将待分析的化合物或物质沉淀在该基质上。然后将该基质组合物植入大鼠的皮下组织持续许多天 (在本实验中是 12 天)。然后对植入物进行组织学和生物化学的分析, 分析它们诱导骨形成的能力 (Sampath, T. K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 6591-6595, 1983; Sampath, T. K. 等, *ibid*, 84: 7109-7113, 1987; Wang, E. *ibid*, 85: 9484-9488; Wang, E. 等, *ibid*, 87: 2220-2224; Sampath, T. K. 等, J. Cell Biol., 98: 2192-2197, 1984)。

5.1.1 实验方法;

随机分配所准备的 20 只雄性 Sprague Dawley 大鼠 (42-49 天龄, 体重 170-220 克), 在氯烷麻醉下将两种移植物穿过背、胸*植入皮下。这些移植物包括四种处理中的一种;

- 5 *阴性对照-仅载体 (去除矿物质的胍抽提的骨基质 DGBM)
- *CMV Egr 1 DNA; 500 微克在载体 DGBM 上
- *CMV Egr 1 DNA; 500 微克加上重组的骨发生蛋白 (BMP)4; 5 微克在载体 DGBM 上, (BMP4 因其趋化影响而被使用)
- *重组 BMP4 蛋白 5 微克在载体 DGBM 上

- 10 插入的当天记为第 0 天, 在操作的 12 天以后使用一种计划 1 中提出的方法宰杀所有的大鼠, 去除植入物, 清洗软组织并等分成两份。将一半放于 10%福尔马林中以进行组织学检测, 将另一半冷冻并贮存在-20 摄氏度。该样品在以后用于分析钙含量和碱性磷酸酶活性。

15 5.1.2 去矿物质的大鼠骨骼的制备;

- 除去成年 Sprague Dawley 大鼠的腿节、胫节和肱部的骨干, 剥去软组织并用标准盐溶液冲洗骨髓腔。然后将骨在 100 毫升氯仿:甲醇 (2:1) 中搅动 10 分钟脱脂。该步骤在干燥箱内风干之前重复一次。然后将骨干在液氮中冷冻并在一台 CRC micromill 上磨成粉末。将所得到的粉末筛滤以留下大小严格为 75-425 微米的颗粒, 然后在 0.5 M*HCl 中连续搅拌 3 小时以去矿物质。接着将该混合物以 19,000rpm (Kontron CentriksTl24, 转头 A8.24)、在 15 摄氏度下离心 30 分钟。将沉淀重悬在 100 毫升水中, 搅拌 1 小时并离心。重复该步骤。然后将沉淀重悬在 100 毫升乙醇中, 搅拌 1 小时并离心。乙醇蒸发消失,
- 25 将样品重悬在 4M 盐酸胍/50 mM Tris, pH7.4 中并搅拌过夜。然后进行进一步的离心, 沉淀重悬在 50 毫升水中, 搅拌 1 小时并离心。该步骤再重复两次。然后将样品在干燥箱内干燥过夜。DNA 通过机械混合和冻干法加入到骨上。

30 5.2 组织学检测

 在初始的福尔马林固定之后, 将样品包埋在甲基丙烯酸甲酯中, 切成 1 微米的薄片并用冯科萨斯 (Von Kossa) 和甲苯胺蓝染色。然后

让不了解检测物质的病理学家顾问对来自各植入的三个非毗邻的切片进行评估并平均得分。

采用一种用于软骨和骨的标准评分系统；

+/-试验性鉴定骨或软骨

- 5 1. >10%各切片新软骨或骨
2. >25%各切片新软骨或骨
3. >50%各切片新软骨或骨
4. >75%各切片新软骨或骨
5. >80%各切片新软骨或骨

10

5.3 生化检测

将组织在 2 毫升冰浴的 0.25 M 蔗糖-3mM NaHCO₃ 中匀浆。将匀浆物在 12,000g、12 摄氏度离心 15 分钟，收集上清液用于酶切分析。使用比色分析，用对硝基苯磷酸盐 (PNP) 作为底物，测定碱性磷酸酶的活性。在检测样品与 PNP 在 37 摄氏度孵育之后，在一台标准的微滴定培养皿读出器上，确定 405 nm 处的光密度。

15

5.4 结果

结果如图 5 所示。将每只大鼠中的两个植入位点的数据彼此独立地进行分析。提供了中值和四分位差 (IQR)，这是由于数据的数值小及倾斜分布。在以上的变数中已经进行了 Kruskal Wallis 试验，发现碱性磷酸酶的水平彼此明显不同。

20

仅在一个组 (CMV Egr-1 DNA/BMP) 中，五个植入位点中的一个植入是骨形成阳性的。采用 12 天这个单一的时间点进行分析的初始实验，其被选择以给出早期的预测结果。在这一时间点上，碱性磷酸酶的活性水平在 CMV Egr-1 DNA 和 CMV Egr-1 DNA/BMP4 组群中相对于对照明显提高。这种碱性磷酸酶活性的临时升高 (作为骨形成的先兆) 典型地是通过物质如 BMP 看出的，BMP 在 10-15 天时刺激骨形成上升到顶峰，以后则下降。这代表的是在内生软骨瘤的骨化早期所看到的上升。到目前为止，在所检测的样品中没有表现出钙含量的明显区别，虽然已经在 CMV-Egr-1/BMP4 组的许多组织学样品中观察到早期钙化。这可以解释为是在生检的时标内钙化仅仅是刚开始。

25

30

5.5 结论

Egr-1 提高了异位骨形成的啮齿类模型中碱性磷酸酶的水平，并且可能促进局部的骨形成。

5

实施例 6

在体外经皮腔内冠状动脉成形术之后，使用 Egr-1 转录因子以促进上皮再生

6.1 方法

10 解冻人或猪的血管平滑肌细胞 (SMC; Clonetics)，保存在培养基中并依据商家的指导对其进行传代直至不迟于第 4 代。用一种含有从 CMV 启动子表达的 Egr-1 cDNA 的表达质粒转染 SMC (Houston 等, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19; 218-289, 1999)。在用
15 荧光素酶报告载体 pGL3 对照 (Promega) 或 Mirus Transit (Cambridge Biosciences) 对 SMC 进行优化之后，使用 Eugene (Boehringer Mannheim) 将 Egr-1 表达 DNA 转染到 SMC 中，两种转染程序均使用 β -半乳糖苷酶作为正规化质粒用于转染对照。

6.2 结果

20 CMV Egr-1 DNA 被转染到人 SMC 中，并通过使用一种多克隆抗体 (Santa Cruz) 的免疫组织化学和过氧化物酶检测对 Egr-1 蛋白进行检测 (Sigma and Vector Laboratories)。CMV Egr-1 DNA 转染的人 SMC (右手画面) 或假转染 (左手画面) 如图 6a 中所示，CMV Egr-1 DNA
25 转染的猪 SMC (右手画面) 或假转染 (左手画面) 如图 6b 中所示。Egr-1 蛋白的表达因棕褐色变而可检测得到。使用 Eugene 6 (进行进一步的体外定性，图 6c) 和 Mirus Transit (进行后来的体内研究，图 6d) 使 DNA 转染达到最优化。在这些数据中，常规使用 4 微克 CMV Egr-1 DNA 用于生长因子活化，采用的脂质:DNA 的比例为 3:1。在体内基因传递实验中也采用脂质:DNA 的比例为 3:1。

30

6.3 结论

在 CMV Egr-1 DNA 转染之后，Egr-1 蛋白在 SMC 中表达。Egr-1

的转染提高了 SMC 来源的 PDGF、HGF 和 VEGF 的产生/分泌。

实施例 7

EGR-1 启动子序列

5 跨越-674 至+12 位核苷酸的人 Egr-1 启动子片段的合成是通过 PCR, 其反应物包括 0.5 微克人胎盘基因组 DNA 作为模板, 0.4 mM dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP, 25 皮摩尔正向引物 (5'-GGC CAC GCG TCG TCG GTT CGC TCT CAC GGT CCC-3', Mlu 1 限制性酶切位点下划线), 25 皮摩尔反向引物 5'-GCA GCT CGA GGC TGG ATC TCT CGC GAC
10 TCC-3' (Xho1 位点下划线) 以及 Vent DNA 聚合酶 (NEB)。将 PCR 片段用 Mlu 1 和 Xho1 酶切, 琼脂糖凝胶纯化并将其克隆到载体 pGL3 基础 (Promega) 的多克隆位点上的 Mlu 1 和 Xho1 位点之间。

现在已经得到了全序列, 使所发表的序列中的“缺口”被填满。这如图 7 所示, 其中由本发明者们得到的完整序列 (GW SEQ) 与以前所
15 发表的序列 (ON SEQ) 进行比较。该启动子序列是有功能的, 并且已经在内皮细胞上的切变应力研究中被研究。

在已发表的人 Egr-1 启动子序列和我们所描述的序列 (图 8) 之间的一个重要的区别, 位于两个以前未被认识的 SRE 上。虽然所发表的 SRE5 和 SRE1 序列不结合血清应答因子 (SRF), 也没有功能 (Nurris
20 SJ, Treisman R, Mol Cell Biol 1995, 15(8):4076-85), 但我们发现它们与 SRE 共有序列 (图 7) 一致。

我们已经集中于 SRE5。新的 SRE5 及其相关的 Ets 转录因子结合位点作为一种双链低聚核苷酸被合成, 并插入到 SV40 最小启动子载体 (pSV40) 上游的 Nhe I 位点。

25 SRE5 具有序列;

AG

GCTGCGACCCGGAATGCCATATAAGGAGCAGGAAGGATCCCCCGCCGGCG
ACGCTGGGCCTTTACGCTATATTCCTCGTCCTTCCTAGGGGGCGGCCGA

30

2 个 Ets 位点是黑体, SRE 下被划线。突出的 AG 是被用于克隆到 pGLE 启动子的部分填满的 Nhe 位点。

将所得到的报告质粒 pSVSRE5 与 pFA-dbd 质粒(编码 Gal4 DNA 结合区域(dbd)的构建物)或 pFA-MEK1(编码 Gal4 DNA 结合区域(dbd)和 MAP 激酶激酶*MEK1 的激酶区域的一种融合蛋白的构建物)一起暂时转染到 HeLa 细胞中。Gal4-MEK1 融合蛋白是组成性地活化的,并使 Elk 1 和 SRF 磷酸化,与 SRE5 结合。

图 10 中所显示的结果表明所分离的 SRE5 序列在 MEK1 存在下被活化 3 倍,而 SV40 启动子仅表现出极微的活化。

结果显示出新的 SRE5 是有功能的。

说明书附图

VEGF 表达

图 1a

0天

金 - DNA



金 + Egr-1 DNA



1天

金 - DNA



金 + Egr-1 DNA



VEGF 表达

图 1b

2天

金 - DNA

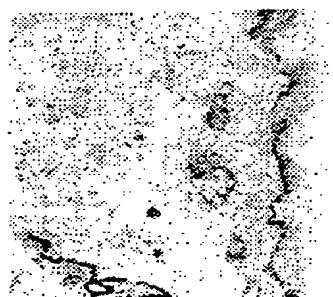


金 + Egr-1 DNA

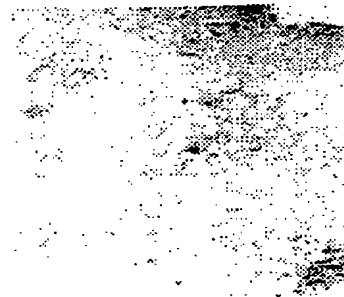


6天

金 - DNA



金 + Egr-1 DNA



01-02-02

TGF- β_1 表达

图 1c

0天

金 - DNA



金 + Egr-1 DNA



1天

金 - DNA



金 + Egr-1 DNA

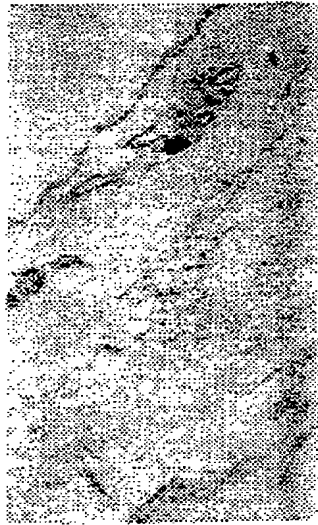


TGF- β_1 表达

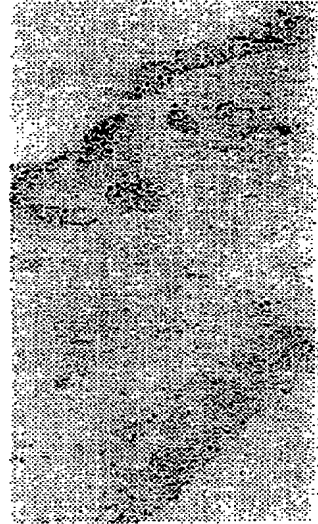
图 1d

2天

金 - DNA

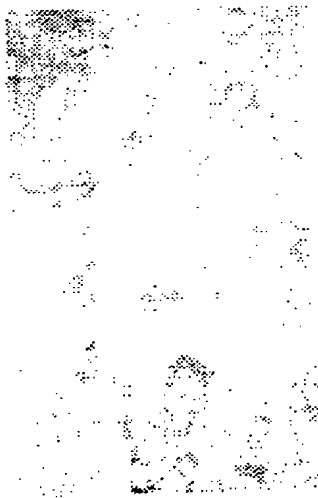


金 + Egr-1 DNA



6天

金 - DNA



金 + Egr-1 DNA



PDGF α 表达

图 1e

0天

金 - DNA



金 + Egr-1 DNA



1天

金 - DNA



金 + Egr-1 DNA



图 1f

PDGF α 表达

2天

金 - DNA



金 +Egr-1 DNA



图 2a

Egr-1对大鼠切除伤口收敛的影响

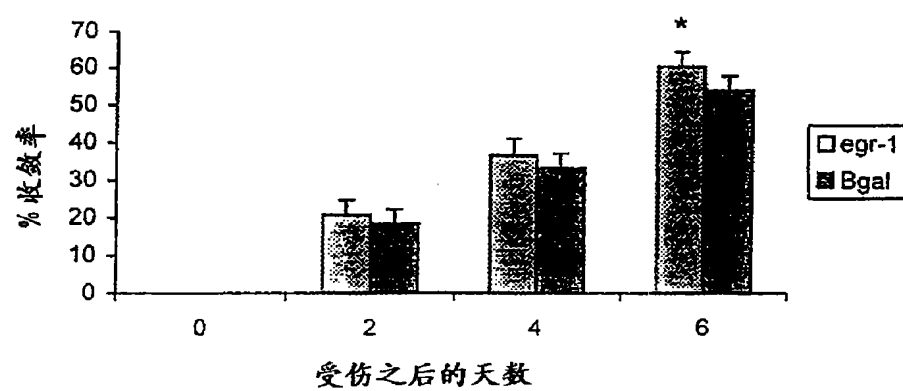


图 2b

Egr-1 DNA转染对大鼠切除伤口组织学愈合的影响

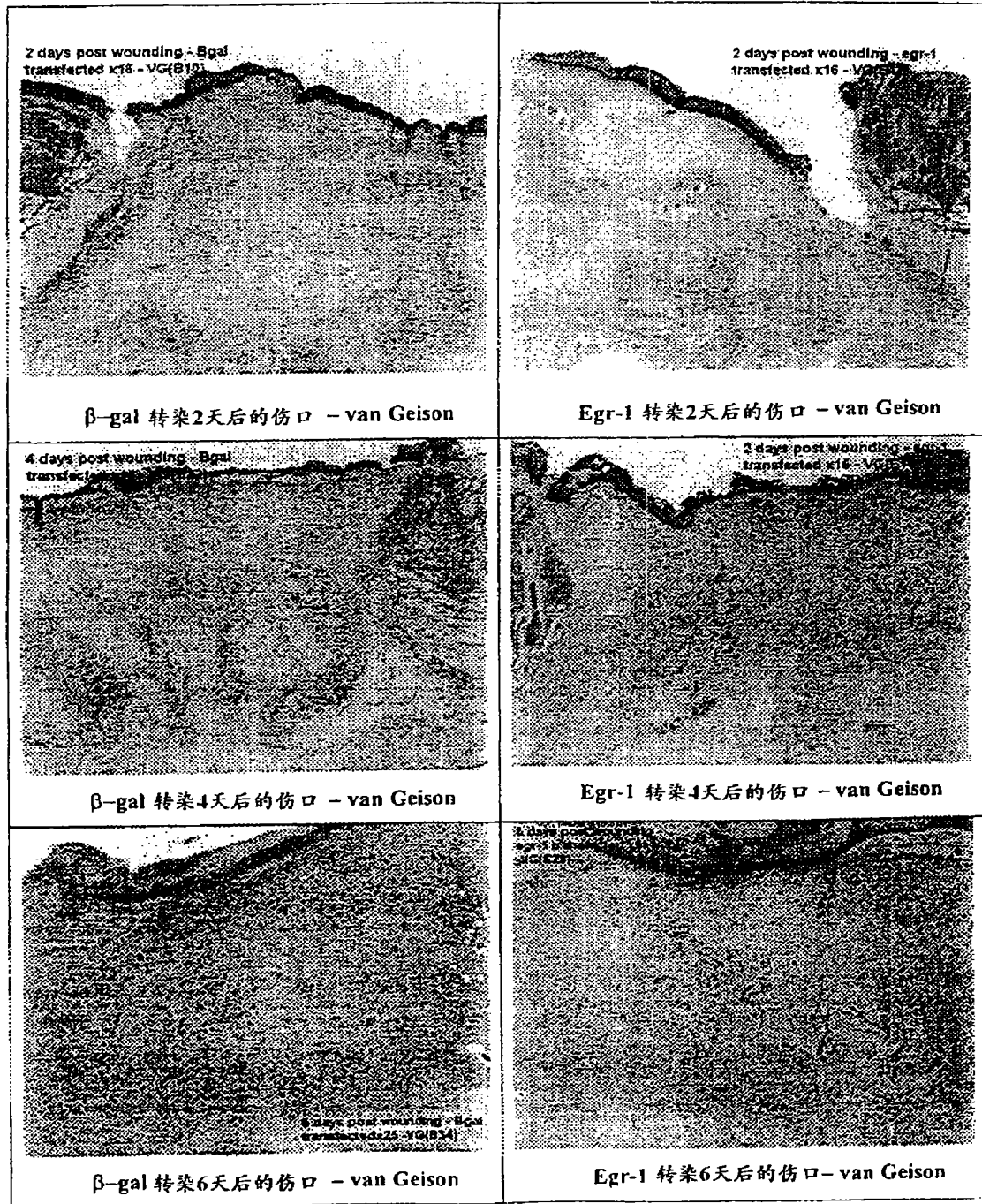


图 2c

Egr-1 对大鼠切除伤口中胶原蛋白沉积的影响

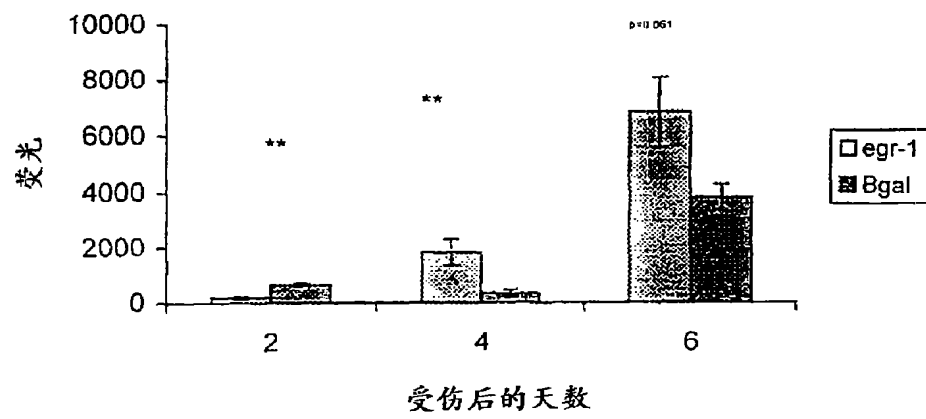


图 2d

采用vWF免疫染色确定的Egr-1对大鼠切除伤口中血管
生成形式的影响

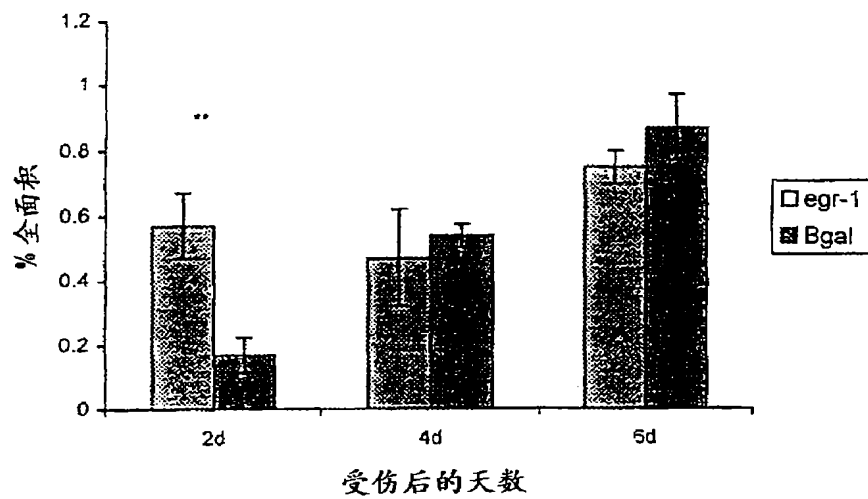


图 3a

使用Mirns TranslT (Cambridge Biosciences)将pGL3荧光素酶
对照质粒转染到血管生成共培养系统中的脂质:DNA比例(V/W)的最优化

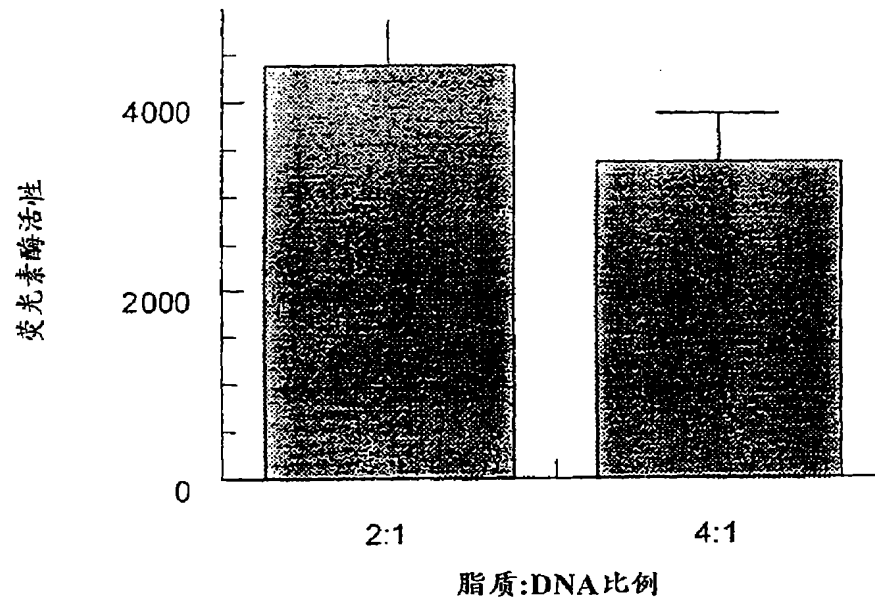


图 3b

Egr-1对血管生成的影响。CMV-Egr-1 DNA如所描述的采用Mirus Transit被转染到共培养物中，显示的是Erg-1超过滴定范围，未处理过的、以及促效剂(VEGF蛋白)和拮抗剂(苏拉明)的影响

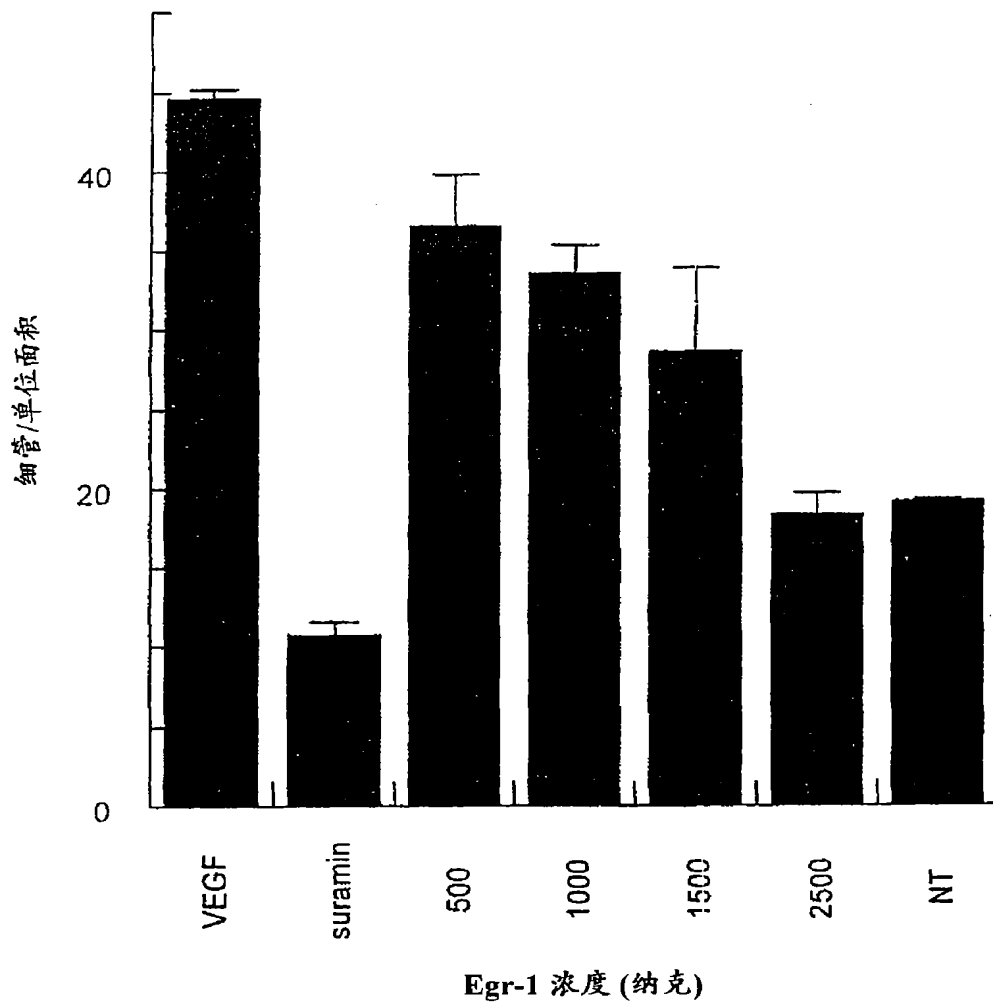


图 4a

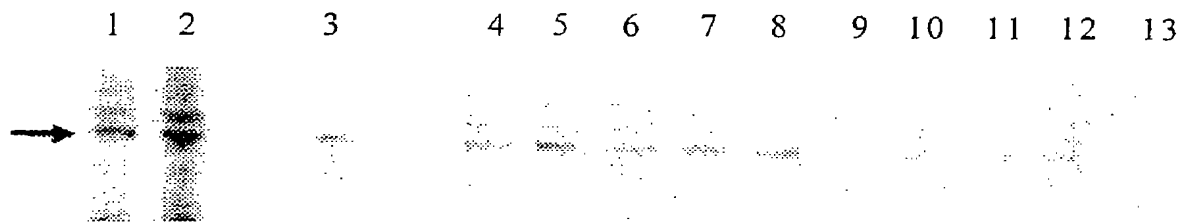
对于每个时间点的每次治疗均有如所显示的三个样品。
每个样品代表从三次重复实验中收集到的细胞

样品鉴定

样品编号	治疗	样品编号	治疗
1	负荷 24 hrs	43	溶质对照 0 hrs
2	↓	44	↓
3	↓	45	↓
4	对照 24 hrs	46	阳性对照 0 hrs
5	↓	47	↓
6	↓	48	↓
7	溶质对照 24 hrs	49	负荷 2 hrs
8	↓	50	↓
9	↓	51	↓
10	阳性对照 24 hrs	52	对照 2 hrs
11	↓	53	↓
12	↓	54	↓
13	负荷 48 hrs	55	溶质对照 2 hrs
14	↓	56	↓
15	↓	57	↓
16	对照 48 hrs	58	阳性对照 2 hrs
17	↓	59	↓
18	↓	60	↓
19	溶质对照 48 hrs	61	负荷 4 hrs
20	↓	62	↓
21	↓	63	↓
22	阳性对照 48 hrs	64	对照 4 hrs
23	↓	65	↓
24	↓	66	↓
25	负荷 72 hrs	67	溶质对照 4 hrs
26	↓	68	↓
27	↓	69	↓
28	对照 72 hrs	70	阳性对照 4 hrs
29	↓	71	↓
30	↓	72	↓
31	溶质对照 72 hrs	73	负荷 6 hrs
32	↓	74	↓
33	↓	75	↓
34	阳性对照 72 hrs	76	对照 6 hrs
35	↓	77	↓
36	↓	78	↓
37	负荷 0 hrs	79	溶质对照 6 hrs
38	↓	80	↓
39	↓	81	↓
40	对照 0 hrs	82	阳性对照 6 hrs
41	↓	83	↓
42	↓	84	↓

图 4b

Western印迹分析负荷的人TE85骨细胞中的Egr-1蛋白



箭头表示Egr-1蛋白。泳道1和2=阳性对照，泳道3=24小时之后的PMA对照。泳道4至8包括分别代表负荷2、4、6、24和48小时，以及泳道8至13是未负荷的对照。

图 4c

负荷后的人TE85骨细胞中产生的PDGF BB的ELISA分析

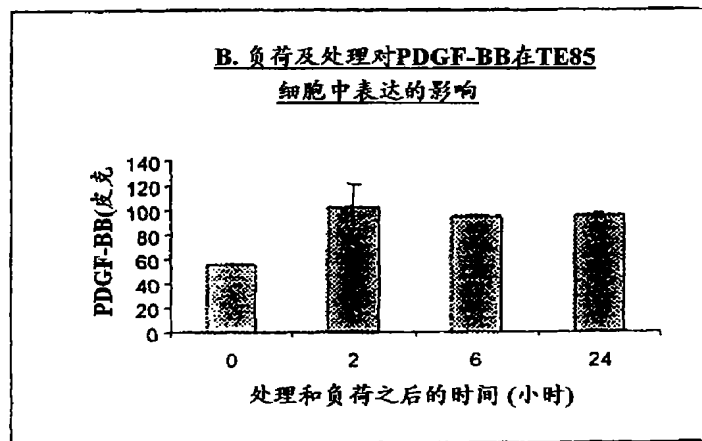
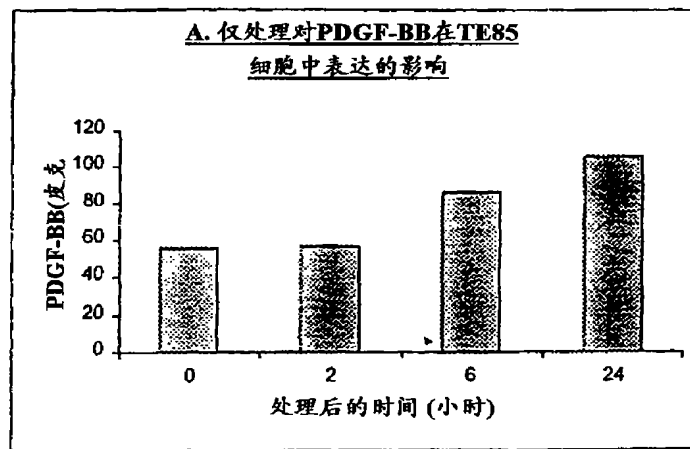


图 4d

CMV-TGF- β 1 转染到 ROS 细胞以后对 VEGF 和 TGF- β 1 的检测

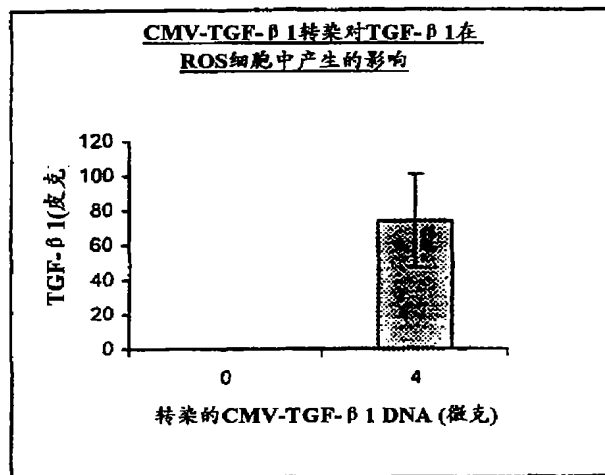
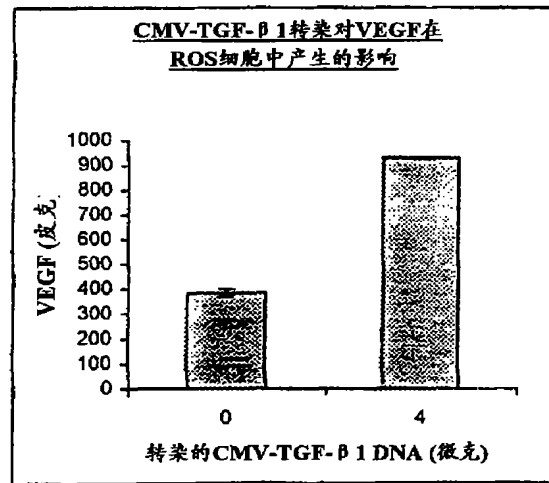


图 4e

CMV-TGF- β 1 转染之后对 MC3t3E1 细胞中 VEGF 和 TGF- β 1 的检测

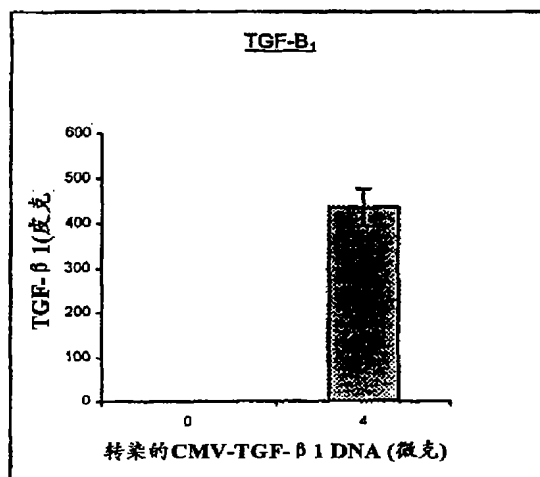
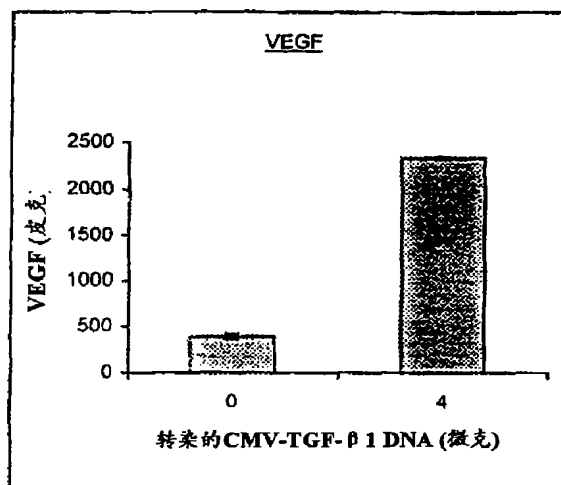


图 5

在异位骨形成的啮齿类模型中Egr-1对碱性磷酸酶水平的影响

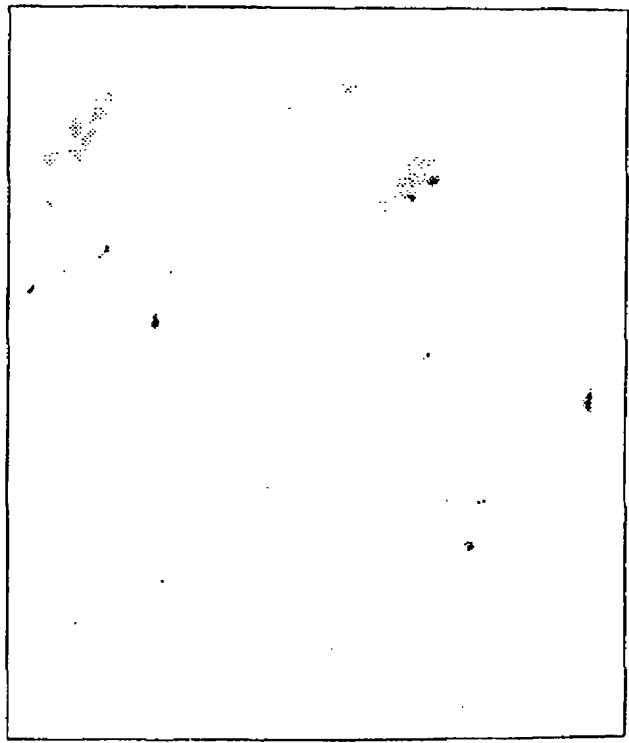
	对照	DNA和BMP	DNA	BMP
	N=10 位点	N=10 位点	N=10 位点	N=10 位点
碱性磷酸酶中值 (IQR)	0.48 (0.28, 0.55)	0.90 (0.66, 1.57)	1.30 (0.55, 2.03)	0.63 (0.53, 1.0)
PNP 中值 (IQR)	5.90 (3.78, 11.26)	17.45 (10.22, 22.23)	18.11 (5.69, 37.73)	15.89 (4.16, 27.76)
	N=5 位点	N=5 位点	N=5 位点	N=5 位点
Ca千重平均值 (SD)	0.106 (0.035)	0.098 (0.035)	0.1060 (0.042)	0.097 (0.032)
Ca千重中值 (IQR)	0.09 (0.09, 0.13)	0.08 (0.08, 0.125)	0.09 (0.07, 0.15)	0.07 (0.06, 0.10)
胶原蛋白中值	0.91 (0.775, 1.455)	1.24 (1.10, 1.45)	0.99 (0.75, 1.23)	0.87 (0.705, 1.50)
骨形成	0	1 位点	0	0

图 6a

CMV Egr-1转染过的人平滑肌细胞的抗-Egr-1抗体染色



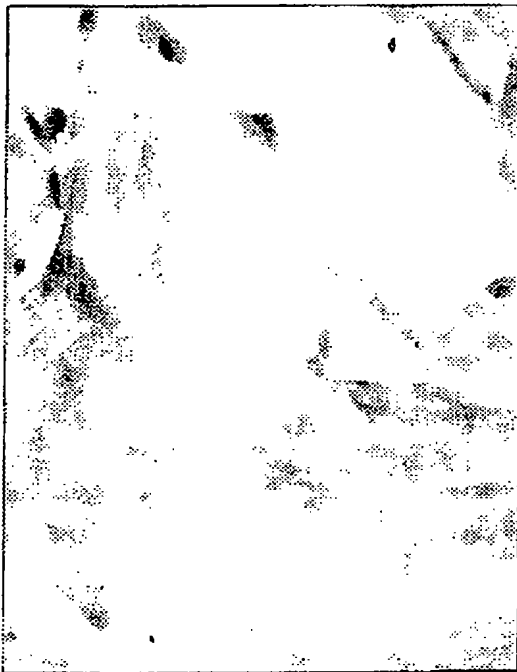
检测



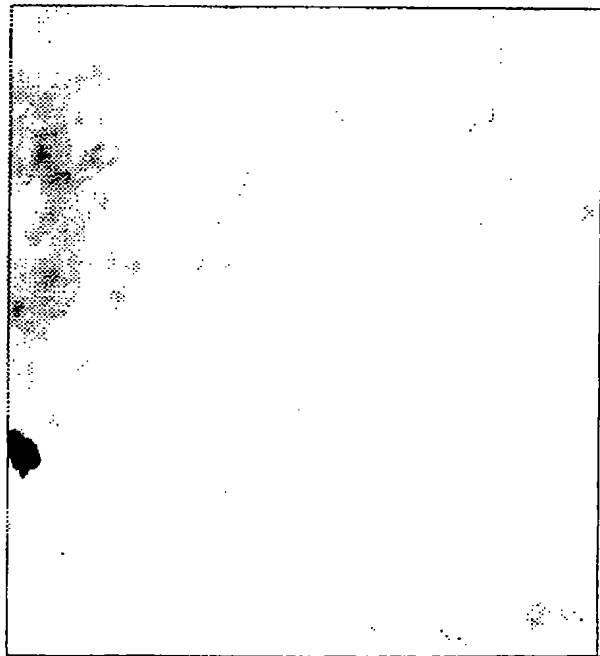
模拟

图 6b

CMV Egr-1 DNA 转染过的猪平滑肌细胞的抗-Egr-1抗体染色



检测



模拟

图 6c

通过Fugene将pGL3荧光素酶对照转染到人SMC内的最优化

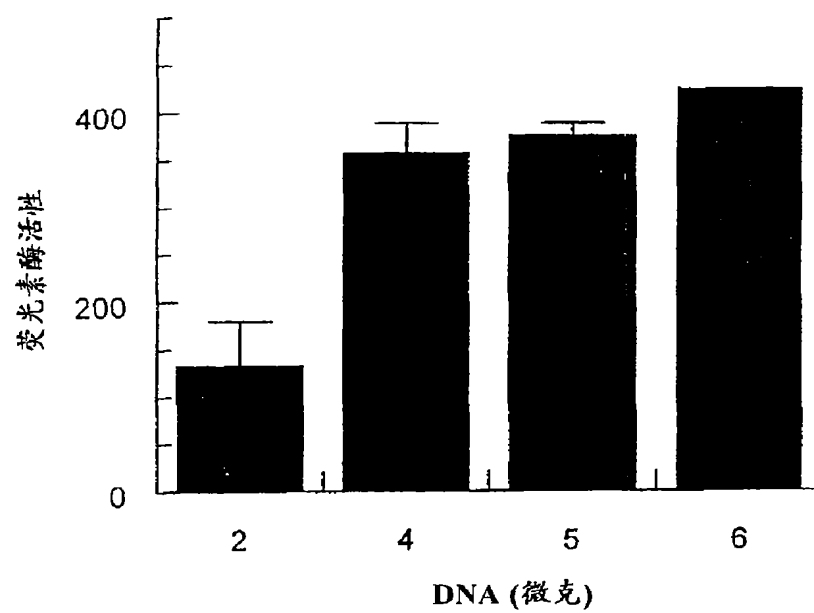


图 6d

通过Fugene将pGL3荧光素酶对照转染到猪SMC的最优化

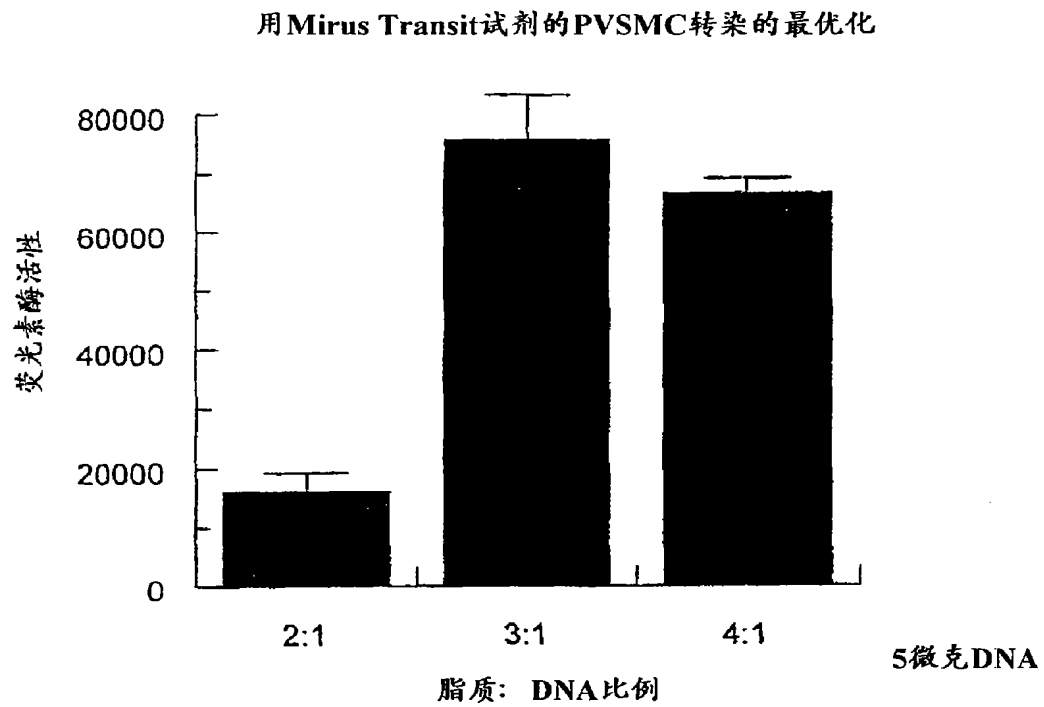


图 6e

通过将CMV-Egr-1转染到人SMC对VEGF产生/分泌的活性

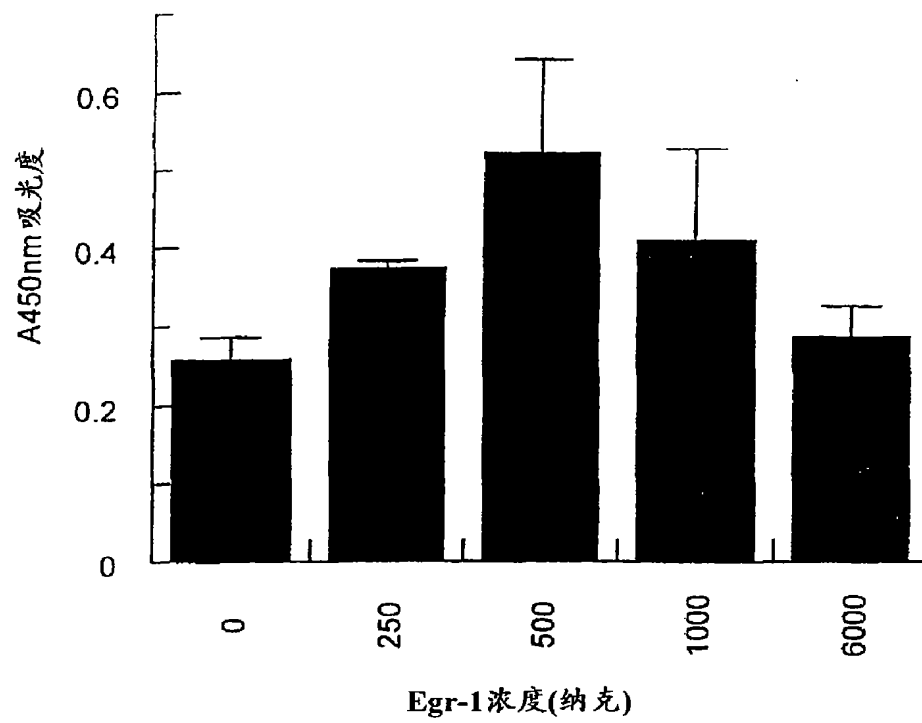


图 6f

通过将CMV-Egr-1转染到人SMC对HGF产生/分泌的影响

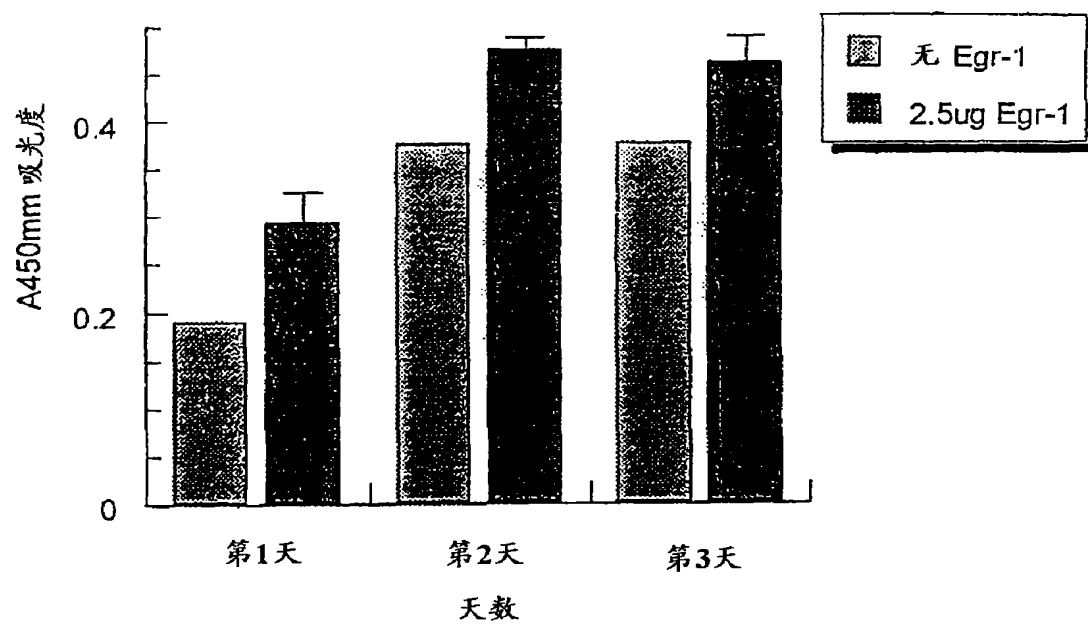


图 6g

通过将CMV-Egr-1转染到人SMC对PDGF产生/分泌的影响

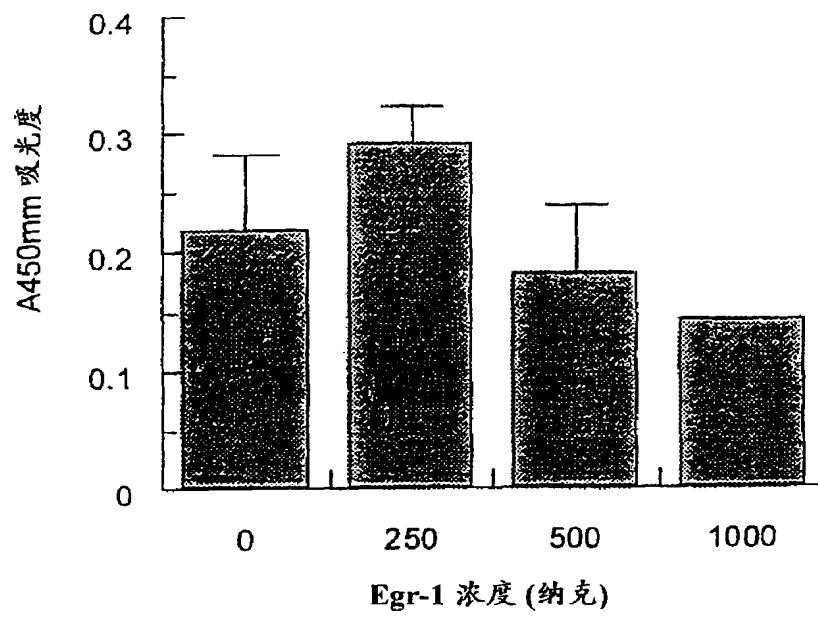


图 6h

受伤前和后对血管壁中的Egr-1蛋白的免疫染色

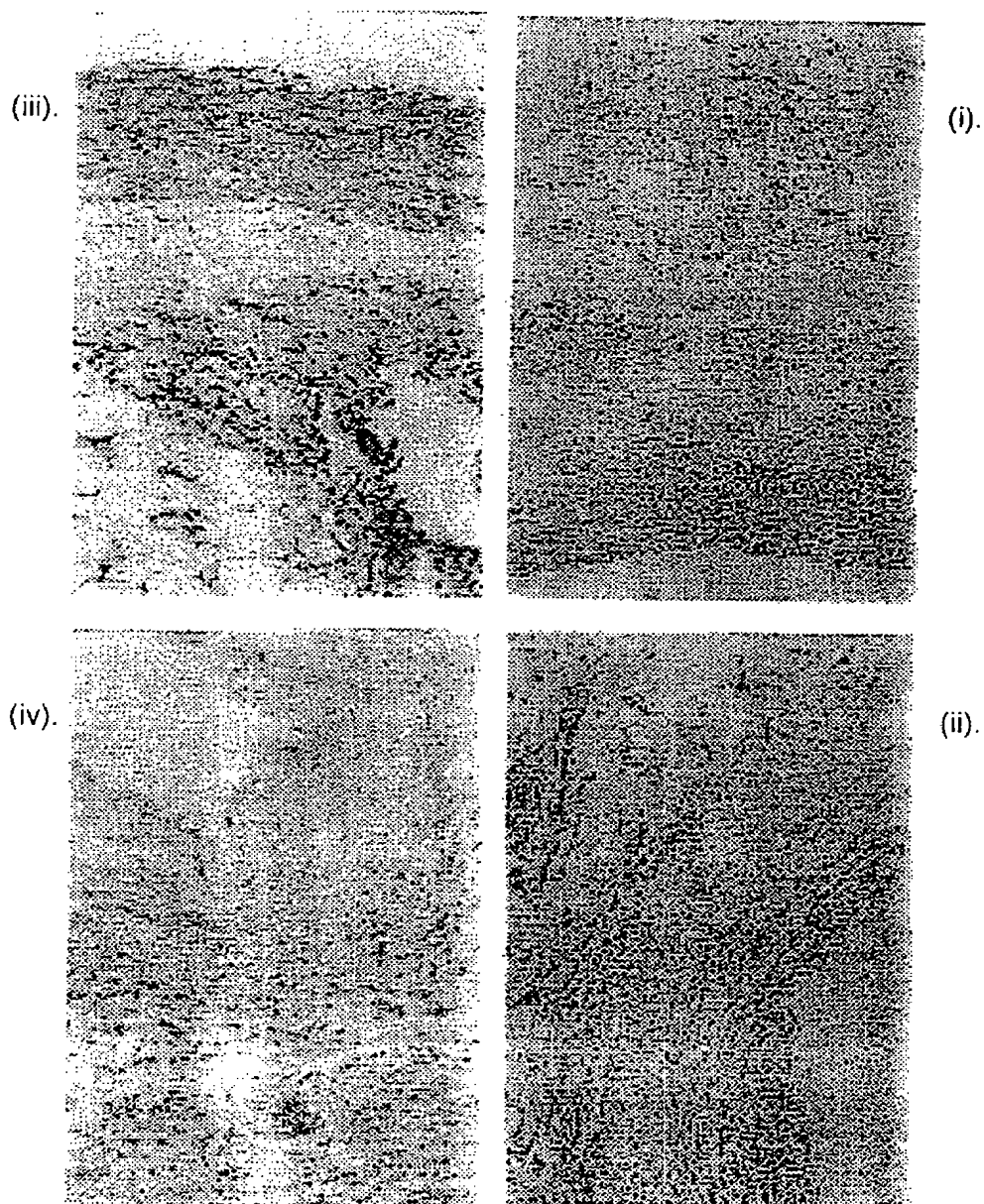


图 7

野生型人 *egr-1* 启动子

			Sp1		cAMP RE		TEA RE	
ON SEQ	CGGTTTCGCTC	TCACGGTCCC	TGAGGT	CGCGGGCC	TGGAT	CGATAGAACC	CCGGC	
GW SEQ	CGGTTTCGCTC	TCACGGTCCC	TGAGGT	CGCGGGCC	TGGAT	CGATAGAACC	CCGGC	
	10	20	30	40	50	60	70	
	EBS							
ON SEQ	TGGCCCTCGC	CTCCCTCTG	GGTCTGGGCT	TCCCCAGCCT	AGTTCACGCC	TAGGAGCCGC	CTGAGCAGCC	
GW SEQ	TGGCCCTCGC	CTCCCTCTG	GGTCTGGGCT	TCCCCAGCCT	AGTTCACGCC	TAGGAGCCGC	CTGAGCAGCC	
	80	90	100	110	120	130	140	
	Sp1							
ON SEQ	GCGC.CA.AG	CGCCACACGC	CACGAGCCCT	CGCGCTGG	GCGTCCCCGG	ATCCCGCGAG	CGCTCGGGCT	
GW SEQ	GCGCGCCAG	CGCCACACGC	CACGAGCCCT	CGCGCTGG	GCGTCCCCGG	ATCCCGCGAG	CGCTCGGGCT	
	150	160	170	180	190	200	210	
	SRE5							
ON SEQ	CCCGGCTTGG	AACCAGGGAG	GAGGGAGGGA	GCGAGGGAGC	AACCAGCT.C	GGACC.GGA	ATGCAATATA	
GW SEQ	CCCGGCTTGG	AACCAGGGAG	GAGGGAGGGA	GCGAGGGAGC	AACCAGCTGC	G.ACCCGGA	ATGCAATATA	
	220	230	240	250	260	270	280	
	SRE5		SRE4		SRE3			
ON SEQ	CGACGAGGA	AGGATCCCCC	GCCGGAGCA	CGCTTATATG	GGGAGGAC	CAATTCGAG	CGGCGCAT	
GW SEQ	CGACGAGGA	AGGATCCCCC	GCCGGAGCA	CGCTTATATG	GGGAGGAC	CAATTCGAG	CGGCGCAT	
	290	300	310	320	330	340	350	
ON SEQ	GCGGCGGC.G	CTTCCGCCTC	TGGGAGGAGG	GAAGAAGGCG	GAGGGAGGGG	CAACGCGGGA	ACTCCGGAGC	
GW SEQ	GCGGCGGCCG	CTTCCGCCTC	TGGGAGGAGG	GAAGAAGGCG	GAGGGAGGGG	CAACGCGGGA	ACTCCGGAGC	
	360	370	380	390	400	410	420	
ON SEQ	TGC.CGG.TC	CCGGAGGCC	CGGCGGCGGC	TAGAGCTCTA	GGCTTCCCCG	AAGC.TGGGC	GCCTGGGATG	
GW SEQ	TGCGCGGGTC	CCGGAGGCC	CGGCGGCGGC	TAGAGCTCTA	GGCTTCCCCG	AAGCCTGGGC	GCCTGGGATG	
	430	440	450	460	470	480	490	
	cAMP RE							
ON SEQ	CGGGC.CGGG	C.CGGGCCCT	AGGGTGCAGG	ATGGAGGTGC	CGGGCGCTGT	CGGATGGGGG	GCTTCACCTG	
GW SEQ	CGGGCGCGGG	CGCGGGCCCT	AGGGTGCAGG	ATGGAGGTGC	CGGGCGCTGT	CGGATGGGGG	GCTTCACCTG	
	500	510	520	530	540	550	560	
	SRE2		SRE1					
ON SEQ	ACTCCGGGTC	CTCCC.CCG	CTCCCTGGCA	CTTAGGGCTG	CTGCTTCCC	ATATATG.CC	ATGTACGTCA	
GW SEQ	ACTCCGGGTC	CTCCC GGCCG	CTCCCTGGCA	CTTAGGGCTG	CTGCTTCCC	ATATATGGCC	ATGTACGTCA	
	570	580	590	600	610	620	630	
	TATA							
ON SEQ	CGACGGAGGC	GGACCCGTGC	CGTTCCAGAC	CCTTCATATA	GAGGCGGATC	CGGGGAGTCG	CGAGAGATCC	
GW SEQ	CGACGGAGGC	GGACCCGTGC	CGTTCCAGAC	CCTTCATATA	GAGGCGGATC	CGGGGAGTCG	CGAGAGATCC	
	640	650	660	670	680	690	700	
ON SEQ	AGC							
GW SEQ	AGC							
	713							

图 8

突变的人 *egr-1* 启动子

CGGTTGCTC TCACGGTCCC TGAGGTGGGGGGGGGGCC TGGATGACAGCGATAGAACC CCGGCCGGAG
 10 20 30 40 50 60 70

EBS
 TGGCCCTCGC TATCGCTCTG GGTCTGGGCT TCCCCAGCCT AGTTCACGCC TAGGAGCCGC CTGAGCAGCC
 80 90 100 110 120 130 140

Sp1
 GCGCGCCAG CGCCACACGC CACGAGCCCT CCCGGCTGG GCGTCCCCGG ATCCCGCGAG CGCTCGGGCT
 150 160 170 180 190 200 210

SRE5
 CCCGGCTTGG AACCAGGGAG GAGGGAGGGA GCGAGGGAGC AACCAGCTGC G.ACCCGGAATGCCATTA
 220 230 240 250 260 270 280

SRE5 SRE4 SRE3
 AGGAGCAGGA AGGATCCCCC GCCGGAACAA CCCCTTATTTCGGCGGACCTTATTTGGAGTGGCCGATAT
 290 300 310 320 330 340 350

GCGCGGCCG CTTCGGCTC TGGGAGGAGG GAAGAAGGCG GAGGGAGGGG CAACGCGGGA ACTCCGGAGC
 360 370 380 390 400 410 420

TGCGCGGGTC CCGGAGGCCC CGGCGGCGGC TAGAGCTCTA GGCTTCCCCG AAGCCTGGGC GCCTGGGATG
 430 440 450 460 470 480 490

CGGGCGCGGG CGCGGGCCCT AGGGTGCAGG ATGGAGGTGC CGGGCGCTGT CGGATGGGGG GCTTGGCGG
 500 510 520 530 540 550 560

SRE2 SRE1
 ACTCCGGGTC CTCCGGGCCG GTCCCGCATATTAGGCTTCTGCTTCCC ATATATGGCC ATGTACGTCA
 570 580 590 600 610 620 630

TATA
 CGACGGAGGC GGACCCGTGC CGTTCCAGAC CCTTCATATA GAGGCGGATC CGGGGAGTCG CGAGAGATCC
 640 650 660 670 680 690 700

AGC
 713

图 9

已发表的小鼠Egr-1基因的5'上游序列

-935	ACGGAGGGAA	TAGCCTTTCG	ATTCTGGGTG	GTGCATTGGA	AGCCCCAGGC	-876	TCTAAAACCC
-875	CCAACCTACT	GACTGGTGGC	CGAGTATGCA	CCCGACTGCT	AGCTAGGCAG	-816	TGTCCCAAGA
-815	ACCAGTAGCC	AAATGTCTTG	GCCTCAGTTT	TCCCGGTGAC	ACCTGGAAAG	-756	TGACCCTGCC
-755	ATTAGTAGAG	GCTCAGGTCA	GGGCCCCGCC	TCTCTGGGC	GGCCTCTGCC	-696	CTAGCCCGCC
-695	CTGCCGCTCC	TCCTCTCCGC	AGGCTCGCTC	CCACGGTCCC	CGAGGTGGGC	-636	GGGTGAGCCC
-635	AGGATGACGG	CTGTAGAACC	CCGGCCTGAC	TCGCCCTCGC	CCCCGCGCCG	-576	GGCCTGGGCT
-575	TCCCTAGCCC	AGCTCGCACC	CGGGGGCCGT	CGGAGCCGCC	GCGCGCCAG	-516	CTCTACGCGC
-515	CTGGCCCTCC	CCACGCGGGC	GTCCCCGACT	CCCGCGCGCG	CTCAGGCTCC	-456	CAGTTGGGAA
-455	CCAAGGAGGG	GGAGGATGGG	GGGGGGGGTG	TGCGCCGACC	CGGAAACGCC	-396	ATATAAGGAG
-395	CAGGAAGGAT	CCCCGCGCCG	AACAGACCTT	ATTGGGCAG	CGCCTTATAT	-336	GGAGTGGGCC
-335	AATATGGCCC	TGCCGCTTCC	GGCTCTGGGA	GGAGGGGCGA	GCGGGGGTTG	-276	GGGCGGGGGC
-275	AAGCTGGGAA	CTCCAGGCGC	CTGGCCCGGG	AGGCCACTGC	TGCTGTCCA	-216	ATACTAGGCT
-215	TCCAGGAGC	CTGAGCGCTC	GCGATGCCGG	AGCGGGTCGC	AGGGTGGAGG	-156	TGCCCACCAC
-155	TCTTGGATGG	GAGGGCTTCA	CGTCACTCCG	GGTCCTCCCG	GCCGGTCCTT	-96	CCATATTAGG
-95	GCTTCTGCT	TCCCATATAT	GGCCATGTAC	GTACGGGCGG	AGGCGGGCCC	-36	GTGCTGTTC
-35	AGACCCTTGA	AATAGAGGCC	GATTGCGGGA	GTGCGAGAG	ATCCAGCGC	+25	GCAGAACTTG
+26	GGGAGCCGCC	GCCGCGATTG	GCCGCGCCCG	CCAGCTTCCG	CCGCCGCAAG	+85	ATCGGCCCCCT
+86	GCCCCAGCCT	CCGCGGCAGC	CCTGCGTCCA	CCACGGGCCG	CGGCTACCGC	+145	CAGCCTGGGG
+146	GCCCCACCTAC	ACTCCCCGCA	GTGTGCCCCCT	GCACCCCGCA	TGTAACCCGG	+205	CCAAACCCCG
+206	GCGAGTGTGC	CCTCAGTAGC	TTCGGCCCCG	GGCTGCGCCC	ACCACCCAAC	+265	ATCAGTTCTC

图 10

通过pFA-MEK1过滤转染对SRE5的活化

	PSV40(活化倍数)	PSVSRE5(活化倍数)
PFA-dbd	1	2.15
PFA-MEK1	1.13	6.70

Gene therapy method

Publication number: CN1311822

Publication date: 2001-09-05

Inventor: BRADDOCK M (GB); CAMPBELL C J (GB);
SCHWACHTGEN J-L (GB)

Applicant: GLAXO GROUP LTD (GB)

Classification:






- international: *C12N15/09; A61K35/76; A61K38/00; A61K38/17;
A61K48/00; A61P17/02; A61P43/00; C07K14/47;
C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10;
C12Q1/68; C12N15/09; A61K; A61K35/66; A61K38/00;
A61K38/17; A61K48/00; A61P17/00; A61P43/00;
C07K14/435; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21;
C12N5/10; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/79;
A61K38/17; A61K48/00; C07K14/47; C07K14/475*

- European: A61K38/17A2; C07K14/47A1B

Application number: CN19998009287 19990602

Priority number(s): GB19980011836 19980602; GB19980015035
19980711; GB19980019846 19980912;
GB19980028578 19981223

Also published as:

 WO9962561 (A3)
 WO9962561 (A2)
 EP1083934 (A3)
 EP1083934 (A2)
 US6689758 (B1)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for CN1311822

Abstract of corresponding document: **WO9962561**

The invention relates to the use of an Egr-1 transcription factor polypeptide or a biologically active fragment thereof, and to nucleic acid molecules encoding such polypeptides, in the manufacture of a medicament for the treatment of wounds in a mammal, including human. In addition, it relates to a sequence that is believed to include important regions involved in the transcription of the transcription factor Egr-1 in humans and in the regulation thereof. This sequence can be used to design appropriate nucleic acid molecules and vectors that can be used in the treatment of wounds, as well as in other treatment.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide